Untersuchungen über die enzymatischen Aktivitäten des 5S RNS-Protein-Komplexes von Escherichia coli

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereiches Pharmazie (22)

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus-Peter Paehlke

aus Braunschweig

Berlin 1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0033

Untersuchungen über die enzymatischen Aktivitäten des 5S RNS-Protein-Komplexes von Escherichia coli

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie (22)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus-Peter Paehlke

aus Braunschweig

Berlin 1977

Referent: Professor Dr. H. G. Wittmann

Korreferenten: Professor Dr. H. Fenner
Professor Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 18. März 1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereichs Pharmazie der
Freien Universität Berlin

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	7
1.1. Proteinbiosynthese	7
1.1.1. Initiation	8
1.1.2. Elongation	8
1.1.3. Termination	11
1.2. Ribosom	11
1.2.1. Ribosomale Proteine	16
1.2.2. Ribosomale RNS	17
1.3. 5S RNS	18
1.4. 5S RNS-Protein-Komplex	23
2. PROBLEMSTELLUNG	24
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. Puffer, Lösungen, Materialien und Geräte	25
3.1.1. Standard Puffer und Lösungen	25
3.1.2. Materialien	26
3.1.3. Geräte	27
3.2. Anzucht von Escherichia coli (A19)	27
3.3. Präparation von Ribosomen	28
3.3.1. Aufbrechen der Zellen	28
3.3.2. 50S und 30S Untereinheiten	29
3.4. Präparation ribosomaler RNS	30
3.4.1. Phenolextraktion von Ribosomen	30
3.4.2. Isolierung der ribosomalen 5S RNS durch Sephadex G-100 Gelfiltration	31
3.4.3. Isolierung der ribosomalen 23S RNS durch Saccharosegradienten-Zentrifugation	32
3.5. Extraktion von ribosomalen Proteinen	32
3.5.1. Essigsäureextraktion	32
3.5.2. Extraktion von 50S Untereinheiten mit Harnstoff und Lithiumchlorid	33
3.6. Elektrophoresen	34
3.6.1. Zweidimensionale Elektrophoresen von ribosomalen Proteinen	34

Seite

3.6.2. SDS-Gel-Elektrophorese 34

3.6.3. Polyacrylamidgel-Elektrophorese von ribosomaler RNS 35

3.6.4. Polyacrylamid-Plattengel-Elektrophorese von ribosomaler RNS 35

3.7. Präparation von RNS-Protein-Komplexen 36

3.7.1. Rekonstitution des 5S RNS-Protein-Komplexes E. coli [5S] 36

3.7.2. Rekonstitution des vergrößerten RNS-Protein-Komplexes E. coli [23S+5S] 37

3.8. Funktionsuntersuchungen 38

3.8.1. Bestimmung der ATPase Aktivitäten 39

3.8.2. Bestimmung der Synthese von MS I und MS II 40

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 41

4.1. Spezifischer 5S RNS-Protein-Komplex von E. coli [5S] 41

4.1.1. Charakterisierung des [5S]-Komplexes 41

4.1.2. Identifizierung der ribosomalen Proteine des [5S]-Komplexes 43

4.2. Der um 23S RNS und Proteinen der 50S Untereinheit vergrößerte RNS-Protein-Komplex von E. coli [23S + 5S] 45

4.2.1. Charakterisierung des [23S+5S]-Komplexes 45

4.2.2. Identifizierung der ribosomalen Proteine des [23S+5S]-Komplexes 47

4.3. Untersuchungen der GTPase und ATPase Aktivitäten 51

4.3.1. Bestimmung der ribosomalen ATPase und GTPase Aktivität am Beispiel einzelner ribosomaler Proteine von E. coli, des [5S]- und des [23S+5S]-Komplexes 51

4.3.2. Einfluß von Elongationsfaktor EF-G auf die ATPase und GTPase Aktivität des [5S]- und des [23S+5S]-Komplexes 55

4.3.3. Alkoholische Lösungsmittel und ihr Einfluß auf die ATPase und GTPase-Aktivitäten 60

4.3.4. Antibiotika und ihr Einfluß auf die ATPase und GTPase 62

Seite

4.3.4.1. Einfluß von Erythromycin und Fusidinsäure auf die ATP-Hydrolyse 65

4.3.4.2. Einfluß von Erythromycin und Fusidinsäure auf die GTP-Hydrolyse 67

4.4. Einfluß des "Stringentfaktors" auf die ATP- und GTP-Hydrolyse der RNS-Protein-Komplexe 69

4.5. Untersuchungen von weiteren enzymatischen Aktivitäten 71

5. ZUSAMMENFASSUNG 75

6. LITERATURVERZEICHNIS 77

7. ANHANG 90

7.1. Abkürzungsverzeichnis 90

7.2. Danksagung 92

7.3. Lebenslauf 93

1. EINLEITUNG

1.1. Die Proteinbiosynthese

Die Ribosomen sind als Orte der Proteinbiosynthese bekannt. Die molekularbiologischen Arbeiten der letzten Jahre gaben weiteren Aufschluß über die Struktur und Funktion der Ribosomen (Übersichtsartikel von LUCAS-LENARD und LIPMANN 1971; GARRETT und WITTMANN 1973; HASELKORN und ROTHMAN-DENES 1973; PONGS, NIERHAUS, ERDMANN und WITTMANN 1974; Cold Spring, Harbor Monographie "Ribosomes" 1974;WITTMANN 1976; ERDMANN 1976).

Die Ribosomen von höheren Lebewesen unterscheiden sich zwar in ihrer Größe von denen der Bakterien, jedoch entsprechen sich die wesentlichen Funktionsabläufe der bisher untersuchten Ribosomenklassen. Der folgende Überblick wird sich auf die Funktionsvorgänge im bisher am besten untersuchten Organismus beziehen, des Bakteriums Escherichia coli (E. coli).

Die genetische Information ist in der DNS festgelegt. Diese Erbinformation auf der DNS wird durch komplementäre Basenpaarung auf die mRNS übertragen. Dieser Vorgang wird Transkription genannt. Mit Hilfe der mRNS kann der genetische Code am Ribosom in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt werden. Dieser Übersetzungsvorgang wird als Translation bezeichnet und stellt die Proteinbiosynthese dar. Sie wird in folgende drei Abschnitte unterteilt:

1. die Initiation
2. die Elongation
3. die Termination

1.1.1. Die Initiation

In der Initiationsphase der Proteinbiosynthese wird die Initiator-tRNS, die N-Formylmethionin-tRNS ($fMet\text{-}tRNS_F^{Met}$) durch Wechselwirkung mit dem Initiationscodon AUG oder GUG der mRNS an das Ribosom gebunden. Die Initiator-tRNS unterscheidet sich von den anderen 20 Aminoacyl-tRNS dadurch, daß die Aminogruppe des Methionins durch enzymatische Formylierung blockiert ist. Nur in Anwesenheit der N-Formylmethionin-tRNS kann es zur Bindung des Initiationskomplexes kommen, an dem außerdem die mRNS, die 30S Untereinheit, die 3 Initiationsfaktoren IF_1, IF_2, IF_3 und GTP beteiligt sind. Anschließend lagert sich die 50S Untereinheit an und bildet den 70S-Initiationskomplex. Es lösen sich nun die Initiationsfaktoren ab. In dieser Phase der Initiation findet die IF_2-abhängige Hydrolyse von GTP statt. Der N-Formylmethionin-Rest wird derart verrückt, daß er für die Knüpfung der ersten Peptidbindung bereitsteht. Die Initiator-tRNS befindet sich zu diesem Zeitpunkt in der ribosomalen "P-site" (Peptidyl-tRNS Bindungsstelle). Die Initiation ist damit beendet.

1.1.2. Die Elongation

Das dem Initiationscodon folgende Triplett auf der mRNS bestimmt nun die Anlagerung der nächsten Aminoacyl-tRNS (aa-tRNS) in der ribosomalen "A-site" (Aminoacyl-tRNS Bindungsstelle). Zur Bindung der aa-tRNS an das 70S Ribosom ist vorher die Bildung eines "ternären Komplexes" notwendig, der aus aa-tRNS, dem Elongationsfaktor EF-Tu und GTP besteht. Dieser Komplex bindet nun in der ribosomalen "A-site", wobei das Anticodon der aa-tRNS mit dem komplementären Triplett auf der mRNS durch Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung tritt. Im nächsten Schritt wird in Abhängigkeit von EF-Tu das GTP gespalten, um ähnlich dem Initiationsvorgang den Aminoacylrest in die Position

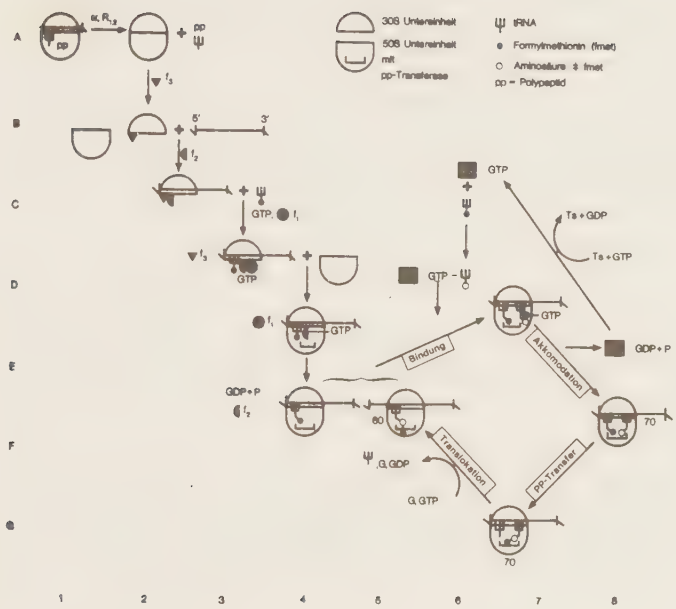


Abb. 1: Schema der Proteinbiosynthese
(von NIERHAUS und WEBER 1972)
Angaben siehe Text

zu bringen, von der aus die Knüpfung der Peptidbindung erfolgen kann. Gleichzeitig verändert sich die Struktur des EF-Tu-GDP komplexes. Dieser Komplex verliert die Affinität zum Ribosom und dissoziiert daher ab.

Ein weiterer Elongationsfaktor EF-Ts ermöglicht die Regenerierung des EF-Tu, indem das GDP gegen GTP nach folgender Summenformel ausgetauscht wird:

EF-Tu-GDP + EF-Ts + GTP —— EF-Tu-GTP + EF-Ts + GDP

Der nächste Schritt, die Transpeptidierung, wird durch die Peptidyltransferase katalysiert, ein Enzym, dessen aktives Zentrum auf der ribosomalen 50S Untereinheit liegt. Das Formylmethionin der Initiations-tRNS, die sich in der ribosomalen "P-site" befindet, wird mit der α-Aminogruppe der Aminoacyl-tRNS in einer Peptidbindung verknüpft. Nach dieser Peptidyltransferasereaktion verläßt die unbeladene Initiator-tRNS ($tRNS_F^{Met}$) das Ribosom.

Befindet sich in der ribosomalen "A-site" eine Peptidyl-tRNS, so kann ein weiterer Elongationsfaktor EF-G an das Ribosom binden. Es ist die Aufgabe von EF-G, den Translokationsschritt zu begünstigen, d. h. die Peptidyl-tRNS von der ribosomalen "A-site" zu der ribosomalen "P-site" zu bewegen. In dieser Translokationsphase wird gleichzeitig ein neues Triplett der mRNS in die ribosomale "A-site" gebracht, so daß das neue Codon mit der entsprechenden Aminoacyl-tRNS in Wechselwirkung treten kann.

Es ist interessant, daß auch der Elongationsfaktor EF-G mit GTP am Ribosom bindet. Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP erfolgt eine strukturelle Veränderung des Elongationsfaktors. Er verliert seine Affinität für das Ribosom und dissoziiert als EF-G und GDP ab.

1.1.3. Die Termination

Die einzelnen unter Abschnitt 1.1.2. aufgeführten Elongationsschritte wiederholen sich so lange, bis die mRNS dem Ribosom signalisiert, daß die Synthese des bestimmten Proteins vollendet ist. Dieses Signal wird durch eines der drei Terminationstripletts (UAG, UAA oder UGA) gegeben, für die es keine komplementäre tRNS gibt. Wenn eines dieser drei Terminationscodons die ribosomale "A-site" erreicht, tritt ein "Releasefaktor" (RF_1 oder RF_2) mit diesen Tripletts in Wechselwirkung. Ob RF_1 oder RF_2 an das Ribosom binden, wird durch die Sequenz des Terminationscodons bestimmt. Releasefaktor RF_1 reagiert mit den Tripletts UAA und UAG, während RF_2 mit UGA in Wechselwirkung tritt.

Zusätzlich existiert noch der Releasefaktor RF_3, der mit Hilfe von GTP den Terminationsprozeß stimuliert, so daß die Dissoziation des Ribosomen-mRNS-Peptidyl-tRNS-Komplexes erfolgt.

Mit dem neu synthetisierten und freigesetzten Protein ist die Translokation beendet. Die dissoziierten ribosomalen Untereinheiten stehen nun für einen weiteren Proteinbiosynthesezyklus zur Verfügung.

1.2. Das Ribosom

In E. coli wie auch in anderen prokaryontischen Zellen befinden sich die Ribosomen frei im Zytoplasma, während sie in eukaryontischen Zellen an dem weit verzweigten endoplasmatischen Reticulum angeheftet sind. Eine Coli-Zelle kann bis zu 50 000 Ribosomen enthalten. Wird das natürliche Ionenmilieu geringfügig verändert, insbesondere die Magnesiumkonzentration, so zerfallen die Ribo-

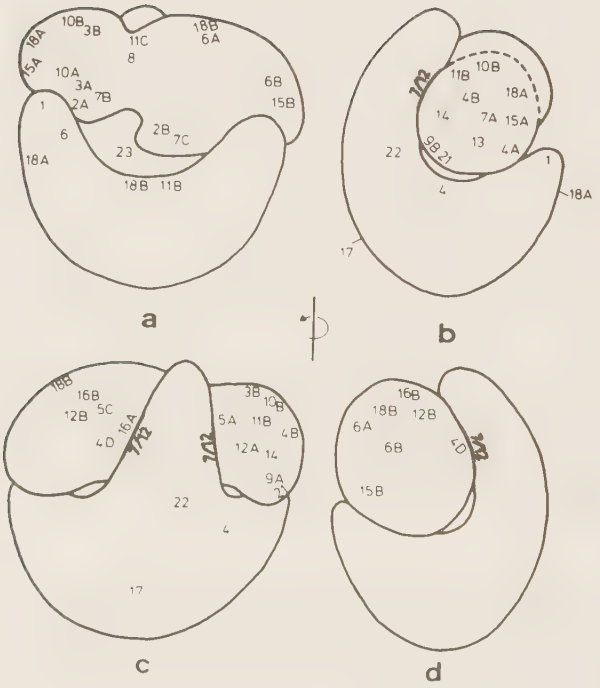


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der ribosomalen 30S und 50S Untereinheit von E. coli (TISCHENDORF et al. 1975)

somen reversibel in eine leichte und in eine schwere Untereinheit. Ihre Charakterisierung wird mit Hilfe eines Sedimentationskoeffizienten, des S-Wertes bestimmt, die eine Maßzahl für die Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens im Schwerefeld der Ultrazentrifuge darstellt und mit dem Molekulargewicht sowie der räumlichen Form eines Partikels zusammenhängt. Prokaryontische Ribosomen haben einen Sedimentationskoeffizienten von 70S, ihre Untereinheiten von 50S und 30S. Eukaryontische Ribosomen sedimentieren mit 80S bzw. 60S und 40S. Das Molekulargewicht des 70S Ribosoms von E. coli beträgt $2,7 \times 10^6$, das der 50S Untereinheit $1,8 \times 10^6$ und das der 30S Untereinheit $0,9 \times 10^6$.

An der dreidimensionalen Struktur des Ribosoms ist in letzter Zeit intensiv gearbeitet worden (LAKE et al. 1974; CANTOR et al. 1974; TRAUT et al. 1974; TISCHENDORF et al. 1975). Von den verschiedenen Methoden sei an dieser Stelle die Immun-Elektronen-Mikroskopie genannt. Komplexe aus Antikörpern mit ihren korrespondierenden ribosomalen Proteinen und jeweils zweier 50S bzw. 30S Untereinheiten konnten elektronenmikroskopisch untersucht werden. Sie gaben Einblick in den räumlichen Aufbau des Ribosoms und besonders über die Verteilung der ribosomalen Proteine in den Untereinheiten (Abb. 2, TISCHENDORF et al. 1975). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnten die Dimensionen des 70S Ribosoms mit 400 Å x 200 Å x 135 Å bestimmt werden.

Das Verhältnis RNS : Protein ist in beiden Untereinheiten von E. coli etwa 2 : 1. Die 30S Untereinheit enthält ein RNS-Molekül mit einem S-Wert von 16 (1600 Nukleotide), die 50S Untereinheit enthält zwei RNS-Moleküle: die 23S RNS und die 5S RNS mit 3200 bzw. 120 Nukleotiden. Die kleine Untereinheit besteht aus 21 Proteinen, die große aus 34 Proteinen (Abb. 3, WITTMANN 1976).

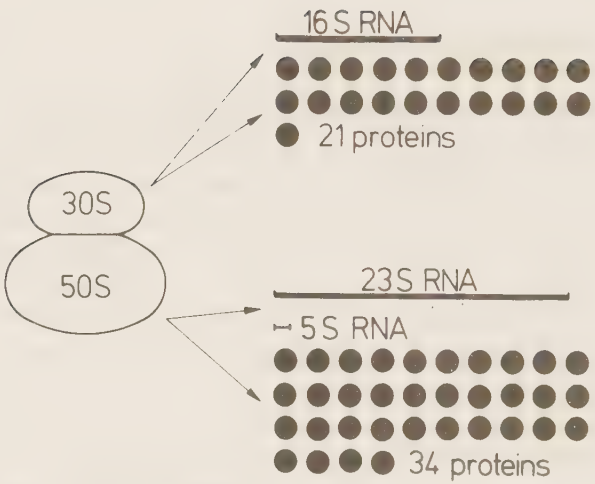


Abb. 3: Bestandteile des E. coli 70S Ribosoms nach WITTMANN (1976)

Bei E. coli und bei Bac. stearothermophilus können sämtliche Bestandteile des Ribosoms isoliert und charakterisiert. Es ist ferner gelungen, die Ribosomen in ihre Komponenten zu trennen und mit Hilfe von Rekonstitutionsversuchen die Untereinheiten wieder zusammenzusetzen (TRAUB und NOMURA 1968; NOMURA und ERDMANN 1970; ERDMANN et al. 1971; NIERHAUS und DOHME 1974; COHLBERG und NOMURA 1976).

Neben der schon anfangs erwähnten Verwendung von Antikörpern stellt die Affinitätsmarkierung eine weitere Methode dar, die Funktionen einzelner ribosomaler Komponenten zu untersuchen. So konnten durch Einführung von chemisch reaktiven Gruppen in ein Substrat aktive Zentren am Ribosom identifiziert werden (PONGS et al. 1974; CANTOR et al. 1974; MAASSEN und MÖLLER 1974).

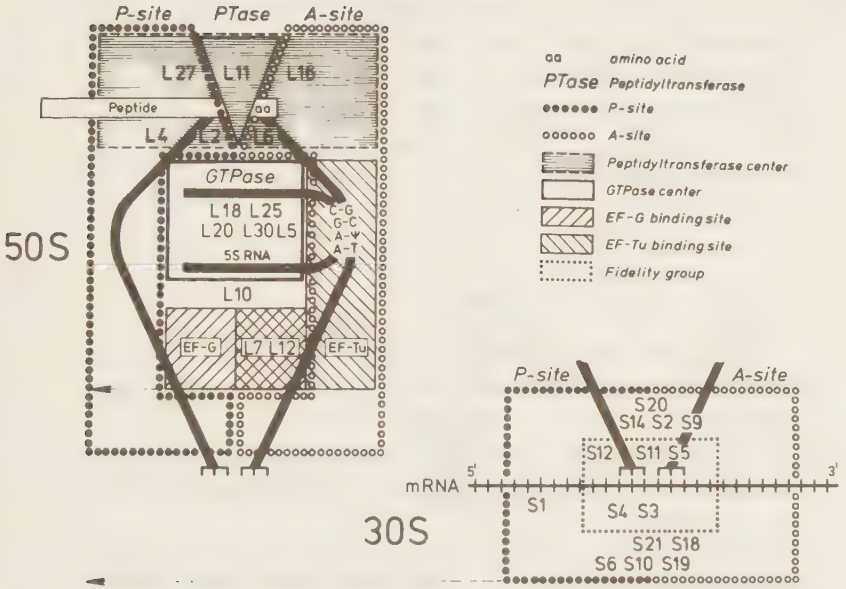


Abb. 4: Schematische Darstellung funktionell wichtiger Proteine und RNS der 30S und 50S Untereinheit von E.coli
(nach PONGS et al. 1974)

1.2.1. Die ribosomalen Proteine

Alle Proteine des E. coli Ribosoms sind inzwischen isoliert worden und ihre Eigenschaften durch chemische, physikalische und immunologische Methoden bestimmt worden.

Eine Auftrennung der 55 verschiedenen ribosomalen Proteine von E. coli gelang durch die zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese (KALTSCHMIDT und WITTMANN 1970). Die Nomenklatur für ribosomale Proteine würde durch die Spezies, Größe der Untereinheit und durch das Wanderungsverhalten in der zweidimensionalen Elektrophorese (2D) festgelegt.

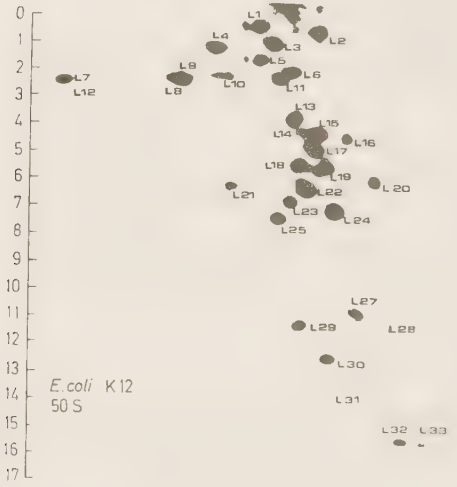


Abb. 5: Zweidimensionale Gel-Elektrophorese von ribosomalen Proteinen der 50S Untereinheit von E. coli K12
(nach HOMANN und NIERHAUS 1971)

Für E. coli sind die Proteine in der kleinen ("small") Untereinheit mit S1 - S21 und in der großen ("large") Untereinheit mit L1 - L34 gekennzeichnet. Die Molekulargewichte dieser Proteine liegen mit einer Ausnahme zwischen 7 000 und 32 000. Viele der Proteine sind reich an basischen Aminosäuren, während in dreien von ihnen die sauren Aminosäuren überwiegen. Die isoelektrischen Punkte der basischen Proteine liegen um pH 10 und darüber, während die der drei sauren Proteine um pH 5 liegen. Zwischen den Proteinen der 30S und 50S Untereinheit bestehen hinsichtlich des isoelektrischen Punktes keine signifikanten Unterschiede.

1.2.2. Die ribosomale RNS

Der Anteil der ribosomalen RNS (rRNS) an der Gesamtmenge aller Nukleinsäuren der Zelle beträgt etwa 80 %. Die Funktion der rRNS liegt vor allem darin, die Proteine an spezifischen Stellen zu binden und durch entsprechende Faltung die Raumstruktur des Ribosoms aufzubauen. 70 % der rRNS von Bakterien und höheren Lebewesen liegen in der Doppelhelixstruktur vor. Als Voraussetzung zur Ausbildung von Doppelhelices dient die komplementäre Basenpaarung. Mit Ausnahme der 5S RNS weisen alle anderen ribosomalen RNS methylierte oder anderweitig modifizierte Basen auf.

In den letzten Jahren wurde intensiv versucht, die Nukleotidsequenz der RNS-Moleküle zu bestimmen.Etwa 90 % der 16S RNS konnte inzwischen sequenziert werden (EHRESMANN et al. 1972), während die Untersuchungen über die Primärstruktur der 23S RNS erst einige Sequenzregionen umfassen. Die Sequenzuntersuchungen haben bisher gezeigt, daß bei den beiden großen rRNS identische oder ähnliche Regionen nicht auftreten.

1.3. Die 5S RNS

In allen bisher untersuchten Organismen konnte in den großen ribosomalen Untereinheiten 5S RNS nachgewiesen werden. Die 5S RNS in E. coli wurde 1963 als Bestandteil der 50S Untereinheit entdeckt (ROSSET und MONIER 1963). Die E.coli 5S RNS war die erste RNS, deren Sequenzierung vollständig gelang (BROWNLEE et al. 1968). Inzwischen sind die Primärstrukturen der 5S RNS aus mehreren Organismen bereits bekannt (siehe Reviews: MONIER 1974, ERDMANN 1976).

Physikalische, chemische und enzymatische Untersuchungen sowie Studien über Oligonukleotid-Bindung ließen weitere Erkenntnisse über die Struktur der 5S RNS zu. Mit der steigenden Zahl der sequentzierten 5S RNS-Moleküle stieg die Zahl der vorgeschlagenen Strukturmodelle. Die möglichen Bereiche, die mit den Proteinen in Wechselwirkung treten oder funktionell von Wichtigkeit sein könnten, sind in diesen Modellen nicht berücksichtigt worden. ERDMANN schlug daraufhin ein Modell der 5S RNS vor, in dem die Primärstrukturen der prokaryontischen 5S RNS-Arten sich in sieben Regionen, die mit A - G bezeichnet werden, unterscheiden (ERDMANN 1976). Die Einteilung in diese Regionen wurde nach dem Grade der Homologie vorgenommen. 100 % Homologie bedeuten, daß eine Region aus einer bei allen untersuchten Prokaryonten vollständig erhaltenen Basensequenz besteht.

Die eukaryontischen 5S RNS-Arten lassen sich ebenfalls in ein solches Modell einordnen. Vergleichende Untersuchungen zwischen den 5S RNS-Arten der Prokaryonten und Eukaryonten ließen den Schluß zu, daß es sich um zwei sehr unterschiedliche Klassen von 5S RNS handelt, die sich in ihren Primärstrukturen beträchtlich unterscheiden (WREDE und ERDMANN 1973, ERDMANN 1976).

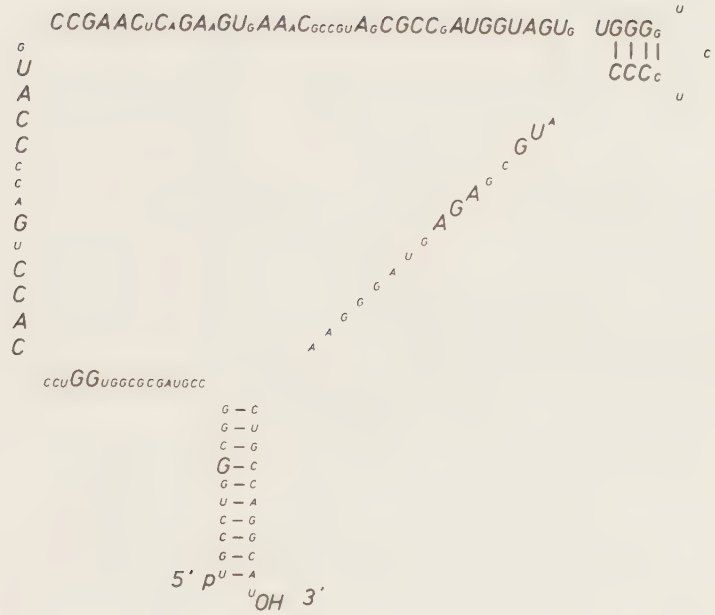


Abb. 6: Modell der Primärstruktur von 5S RNS *E.coli* nach ERDMANN (1976)

In Lösung kann die 5S RNS in verschiedenen molekularen Konformationen vorliegen, die chromatographisch voneinander getrennt werden können (AUBERT et al. 1968). Die Konformation, die die größte Affinität für ribosomale Proteine in der 50S Untereinheit hat und zugleich thermodynamisch am stabilsten ist, wird als nativ bezeichnet. Unter denaturierten Bedingungen kann die native Form in die denaturierte umgewandelt werden. Wiederum ist es durch Erhitzen und in Gegenwart von Mg^{++}-Ionen möglich, die denaturierte Form in eine mit der nativen Form identischen Konformation zu überführen (RICHARDS et al. 1973).

Erste Funktionsstudien ergaben, daß die 5S RNS bei Bakterien eine große Rolle für die biologische Aktivität der 50S Untereinheit spielt. Ohne 5S RNS rekonstitutierte 50S Ribosomen von Bac. stearothermophilus sind in allen Funktionen reduziert aktiv (ERDMANN et al. 1971). Für Bac. stearothermophilus konnte weiter gezeigt werden, daß ohne 5S RNS das Protein B-L5 nicht in die große Untereinheit eingebaut werden konnte (HORNE und ERDMANN 1972). Rekonstitutionen von 50S Ribosomen mit heterologen 5S RNS verschiedener Spezies zeigten deutlich, daß nur prokaryontische 5S RNS in die Bac. stearothermophilus 50S Untereinheit eingebaut werden konnten und volle Aktivität zeigten. Die Rekonstitution mit eukaryontischer 5S RNS gelang nicht (WREDE und ERDMANN 1973).

Von RAACKE wurde vorgeschlagen, daß für den Peptidyltransfer im Ribosom das Uracil am 3'-Ende der 5S RNS wichtig sei (RAACKE 1971). Diese Hypothese konnte widerlegt werden, indem in Rekonstitutionsversuchen eine 5S RNS mit modifiziertem 3'-Ende verwendet wurde. Die rekonstituierte 50S Untereinheit zeigte gute Aktivitäten (ERDMANN et al. 1971; FAHNESTOCK und NOMURA 1972).

Eine weitere wichtige Funktion der 5S RNS ist die tRNS-

Bindung. Alle bisher bekannten tRNS haben in der TΨC-Schleife eine gemeinsame Basenfolge: G-T-Ψ-C-Pu (siehe Abb. 7). Frühere Untersuchungen zeigten, daß die nichtenzymatische Bindung von tRNS an das Ribosom durch das Tetranukleotid T-Ψ-C-G gehemmt wurden (OFENGAND und HENES 1969; SHIMUZU et al. 1970). Auch die Elongationsfaktor EF-Tu abhängige Bindung der tRNS an das Ribosom wurde durch T-Ψ-C-G inhibiert (RICHTER et al. 1973).

Die allen bakteriellen 5S RNS-Spezies gemeinsame Sequenz C-G-A-A-C könnte mit der G-T-Ψ-C-Pu Region der tRNS in Wechselwirkung treten. Dieser Vorschlag wurde experimentell untermauert. Durch Modifikation zweier Adenine der 5S RNS am Ribosom ist nachgewiesen worden, daß diese beiden Basen direkt an der Bindung des tRNS-Tetranukleotids T-Ψ-C-G beteiligt sind (ERDMANN, SPRINZL und PONGS 1973).

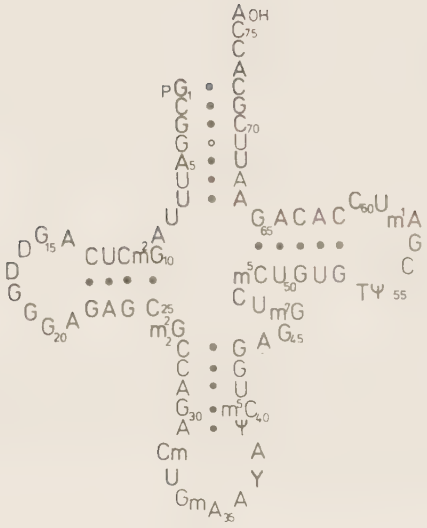


Abb. 7: Allgemeine Kleeblatt-Struktur für tRNS nach RICH und Raj BHANDARY (1976)

1.4. Der 5S RNS-Protein-Komplex

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten spezifische 5S RNS-Protein-Komplexe von E.coli und Bac. stearothermophilus isoliert und charakterisiert werden. Sie enthalten 3 Proteine, E-L5, E-L18 und E-L25 bzw. 2 Proteine, B-L5 und B-L22 (HORNE und ERDMANN 1972).

Diese RNS-Protein-Komplexe sind enzymatisch aktiv. Sie hydrolysieren GTP und ATP zu den entsprechenden Diphosphaten und anorganischem Phosphat (HORNE und ERDMANN 1973; GAUNT-KLOEPFER und ERDMANN 1975). Ähnliche enzymatische Aktivitäten ließen sich auch am 5S RNS-Protein-Komplex von Rattenleber-Ribosomen nachweisen (GRUMMT et al. 1974). Diese hydrolytischen Aktivitäten sind unabhängig von Elongationsfaktoren. Das bedeutet, daß die 5S RNS im GTPase-Zentrum der 50S Untereinheit eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Mit der Photo-Affinitätsmarkierung konnte festgestellt werden, daß ein markiertes Diphosphatnukleotid, das GDP, in Gegenwart von Fusidinsäure und dem Elongationsfaktor EF-G an das E. coli Ribosom bindet. Ferner wurde nachgewiesen, daß die 5S RNS-Bindungsproteine bei der Elongationsfaktor EF-G abhängigen GTPase beteiligt sind (MAASSEN und MÖLLER 1974; SCHRIER und MÖLLER 1975). Diese Befunde unterstützen weiterhin die Hypothese, daß die 5S RNS und ihre Bindungsproteine in der Nähe der ribosomalen "A-site" lokalisiert sein müssen.

2. PROBLEMSTELLUNG

Aus Vorversuchen war bekannt, daß die enzymatischen Aktivitäten des 5S RNS-Protein-Komplexes durch Zugabe des Elongationsfaktors EF-G beeinflußt werden. Die ATPase und GTPase Aktivitäten des [5S]-Komplexes in Gegenwart von EF-G sollten deshalb untersucht werden.

Durch Zugabe von 23S RNS und verschiedenen Proteinen der 50S Untereinheit von E. coli sollte der [5S]-Komplex zu einem [23S+5S]-Komplex vergrößert werden. Dieser vergrößerte RNS-Protein-Komplex sollte dann weiterhin auf ATPase und GTPase Aktivitäten überprüft werden. Ebenfalls sollte eine mögliche Veränderung der enzymatischen Aktivitäten in Gegenwart von dem Elongationsfaktor EF-G untersucht werden.

Ferner sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, welche Einflüsse Antibiotika auf die enzymatischen Aktivitäten der verschiedenen RNS-Protein-Komplexe von E. coli ausüben.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Puffer, Lösungen, Materialien und Geräte

3.1.1. Standard-Puffer und Lösungen

TMA I: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 (23°C); 10 mM Magnesiumchlorid; 30 mM Ammoniumchlorid; 6 mM 2-Mercaptoäthanol.

TMA II: Wie TMA I, jedoch 0,3 mM Magnesiumchlorid.

TR I: 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 (23°C); 20 mM Magnesiumchlorid; 1,0 M Kaliumchlorid; 6 mM 2-Mercaptoäthanol.

TR O: Wie TR I, jedoch ohne Kaliumchlorid.

TR: TR I: TR O = 1 : 2 (Kaliumchlorid = 0,33 M).

Puffer EC: 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0 (23°C); 1 mM Manganchlorid; 0,1 mM Ammoniumchlorid; 6 mM 2-Mercaptoäthanol.

TM 4-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 (23°C); 0,5 mM EDTA; 4 mM Magnesiumchlorid.

TEB-Puffer: 80 mM Tris-HCl, pH 7,4 (23°C);0,1 M Borsäure; 2 mM Na_2-EDTA.

KCL-Puffer: 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 (23°C); 0,35 M Kaliumchlorid; 20 mM Magnesiumchlorid.

10 % Polyacrylamidgel-Lösung für rRNS-Trennung

10 % Polyacrylamid; 0,2 % Bisacrylamid; 3 % Saccharose; 0,05 % TEMED Katalysator (1,2-Bis (dimethylamino)-äthan); 0,03 % Ammoniumpersulfat in TEB-Puffer.

3 % bzw. 12,5 % Harnstoff-Polyacrylamidgel-Lösung

3 % bzw. 12,5 % Acrylamid; 0,4 % Bisacrylamid; 8 M Harnstoff; 0,1 % TEMED und 0,02 % Ammoniumpersulfat in TEB-Puffer.

3,1 % Polyacrylamidgel-Lösung für rRNS-Trennung

3,1 % Polyacrylamid; 0,18 % Bisacrylamid; 5 % Saccharose; 0,05 % TEMED; 0,03 % Ammoniumpersulfat in TEB-Puffer.

G-100 Säulenpuffer für rRNS-Trennung

0,05 M Kaliumchlorid; 1 % Methanol.

Bray's Szintillationsflüssigkeit

0,48 M Naphthalin; 0,018 M PPO (2,5 Diphenyloxazole); 0,62 mM POPO (1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzol); 10 % Methanol; 2 % Äthylenglykol in Dioxan.

3.1.2. Materialien

Amicetin, Althiomycin, Clindamycin (Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan U.S.A.), Streptogramin B (Squibb Co., New Brunswick, New Jersey), Tylosin (Eli Lilly, Indianapolis, Indiana, U.S.A.) und Blasticidin S waren Geschenke von Herrn Dr. B. Weisblum, Dept. of Pharmacology, University of Wisconsin Medical School, Madison, Wisconsin, U.S.A. Erythromycin stearat (Serva, Heidelberg) und Fusidinsäure wurden von Herrn Dr. K. Nierhaus, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, zur Verfügung gestellt. Puromycin und Chloramphenicol wurden von Merck, Darmstadt, geliefert.

Folgende Präparate wurden benutzt:
DEAE-Zellulose von Serva, Heidelberg;
G-100 Sephadex von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden;

(γ-^{32}P) GTP von New England Nuclear, Boston, Mass., U.S.A.
(γ-^{32}P) ATP von The Radiochemical Centre, Amersham, England.

PPO, POPO von Packard Instrument Co., Inc. Warrenville, Illinois, U.S.A.

Standard Chemikalien von Merck, Darmstadt.

Die ribosomalen Proteine von E. coli wurden von Herrn Prof. Wittmann, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, die ^{32}P markierte 5S RNS von E. coli von Dr.

J. Zimmermann vom gleichen Institut zur Verfügung gestellt.

3.1.3. Geräte

Zentrifugen
Sorvall Superspeed RC2-B
Beckman Spinco L2-65K
MSE Superspeed 65

Szintillationszähler
Beckman LS-100

Spektralphotometer
Zeiss PMQ II
Isco Density Gradient Fractionator
LKB Uvicord II Ultraviolett Photometer

3.2. Anzucht von Escherichia coli (A19)

Nährmedium: 10 g Bacto-Peptone, 5 g Hefeextrakt,
5 g Natriumchlorid, 5 g Glukose,
alle Angaben pro Liter.

In einem Giovanola-Fermenter wurden 50 Liter Nährmedium (ohne Glukose) eine Stunde sterilisiert. Die entsprechende Glukoselösung wurde 20 Minuten sterilisiert und anschließend dem Nährmedium zugegeben. 1 Liter der über Nacht gezüchteten Bakterienvorkultur (37°C) wurde zum Animpfen der 50 Liter Medium genommen. Das Wachstum wurde bei 650 nm photometrisch verfolgt. Bei einer Absorption von 0,5 - 0,6 wurde die Aufzucht abgebrochen und die Zellen mit Eis auf 4°C abgekühlt. In einer Padberg-Durchlaufzentrifuge wurden dann die Bakterien abzentrifugiert und bis zur Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

Die so geernteten Zellen entstammten der frühen logarithmischen Wachstumsphase.

3.3. Präparation von Ribosomen

3.3.1. Aufbrechen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden mit der doppelten Menge Aluminiumoxid (Alcoa) bei 4°C in einem Mörser zermahlen, bis eine gleichmäßige Paste entstand. Nachdem 4 Minuten lang konstant gerieben worden war, wurden die aufgebrochenen Zellen und das Alcoa in TMA I Puffer (mit 1 µg DNase pro ml; RNase frei) suspendiert und das Gemisch für 15 Minuten bei 4°C und 15 000 U.p.M. in einer Sorvall Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis gestellt, das Sediment nochmals in TMA I suspendiert und anschließend zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und für 30 Minuten bei 4°C und 20 000 U.p.M. zentrifugiert. Der zuletzt gewonnenen Überstand stellte den bakteriellen Rohextrakt dar (Abb. 8).

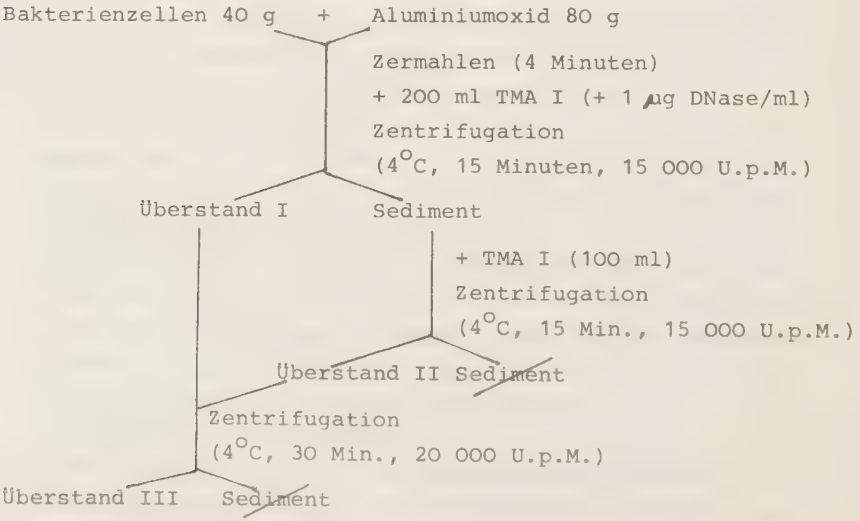


Abb. 8: Aufarbeitung von E.coli 70S Ribosomen

3.3.2. 50S und 30S Untereinheiten

Durch Zonalzentrifugation wurden die im Rohextrakt enthaltenen 70S Ribosomen in ihre 50S und 30S Untereinheiten getrennt (EIKENBERRY et al. 1970). Es wurde ein 6-38 %iger Saccharosegradient (RNase frei; Schwarz/Mann) in TMA II Puffer verwendet. Nach der Zonalzentrifugation wurden die Untereinheiten gesammelt und die Lösungen durch Zugabe von Magnesiumchlorid auf TMA I Pufferbedingungen gebracht. Anschließend wurden die ribosomalen 50S und 30S Untereinheiten mit Polyäthylenglykol 6000 (PEG 6000; Merck) 30 Minuten bei $0^{\circ}C$ gerührt (EXPERT-BESANCON et al. 1974). Die ausgefallenen Untereinheiten wurden dann in einer Sorvall-Zentrifuge bei $4^{\circ}C$ in 60 Minuten bei 12 000 U.p.M. abzentrifugiert. Die Sedimente wurden in TMA I gelöst und bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt.

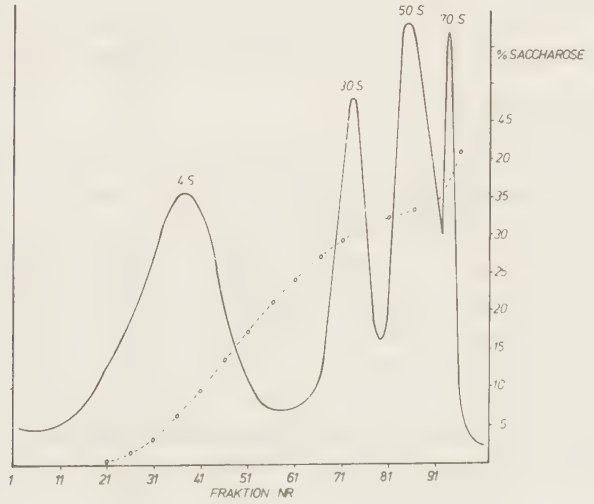


Abb. 9: Profil eines Saccharosegradienten nach der Zonalzentrifugation

3.4. Präparation ribosomaler RNS

3.4.1. Phenolextraktion von Ribosomen

Durch Phenolextraktion von 50S Untereinheiten wurden die 23S RNS und die 5S RNS extrahiert (KURLAND 1960). Es wurde destilliertes Phenol verwendet, das mit einer 0,15 M Natriumchlorid, 0,015 M Natriumzitrat und 0,01 M EDTA-Lösung, pH 7,0, gesättigt worden war.

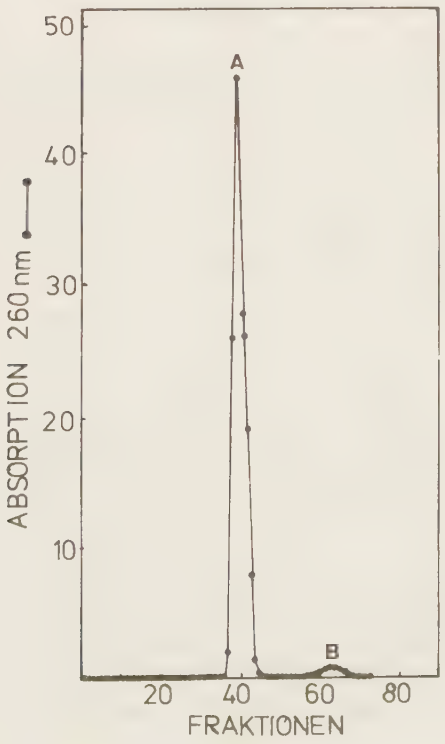
Die Ribosomenlösung sollte etwa 100 A_{260} Einheiten pro ml TMA II enthalten. Zu dieser Lösung wurde eine 0,1 M EDTA-Lösung zugegeben, um das Mg^{++} zu komplexieren. Die Lösung wurde auf 0,1 % Bentonite und 0,2 % NDS gebracht und anschließend mit dem gleichen Volumen Phenol aufgefüllt. Das Gemisch wurde 20 Minuten bei $0^{o}C$ gerührt und dann für 10 Minuten bei 8 000 U.p.M. zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der sich die RNS befand, wurde abpipettiert und nochmals mit dem gleichen Volumen Phenol vermischt. Diese Behandlung wurde so oft wiederholt, bis die Pufferphase nach der Zentrifugation klar war (4-5-malige Extraktion).

Nach der letzten Extraktion wurde die RNS unter Zugabe von zweifachem Volumen absoluten Alkohol bei $-20^{o}C$ über Nacht gefällt. Die Fällung wurde durch Zugabe von 0,01 M Natriumacetat, pH 5,5, beschleunigt. Die ausgefallene RNS konnte für 15 Minuten bei 10 000 U.p.M. in einer Sorvallzentrifuge abzentrifugiert werden. Das RNS-Sediment wurde dann in Wasser gelöst, wobei das Volumen so klein wie möglich gehalten wurde. Die RNS-Lösung mit einer Konzentration von 200-500 A_{260} Einheiten pro ml wurde bis zur weiteren Benutzung bei $-80^{o}C$ aufbewahrt.

3.4.2. Isolierung der ribosomalen 5S RNS durch Sephadex G-100 Gelfiltration

Nach vorangegangener Phenolextraktion von 70S Ribosomen konnte die 5S RNS durch Sephadex G-100 Gelfiltration von 23S RNS, 16S RNS und tRNS getrennt werden (ERDMANN 1971).

Die Sephadex G-100 Säule (3,2 cm x 100 cm) war vorher mit Puffer (s. 3.1.1.) äquilibriert worden. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 22,6 ml pro Stunde. 13 ml pro Fraktion wurden in einem LKB-Fraktionssammler gesammelt. Aufgetragen wurden etwa 2 000 A_{260} Einheiten RNS. Die Fraktionen mit 5S RNS wurden gesammelt, vereinigt und mit doppeltem Volumen absoluten Alkohol bei -20°C vermischt.



Die ausgefallene 5S RNS wurde abzentrifugiert und wiederum in geringem Volumen Wasser resuspendiert. Die 5S RNS-Lösung mit einer Konzentration von 30-50 A_{260} Einheiten pro ml wurde bei -80°C aufbewahrt

Abb. 10:
Trennung von Phenolextrahierter RNS aus 70S Ribosomen durch Gelfiltration

A = 23S RNS und 16S RNS
B = 5S RNS

3.4.3. Isolierung der ribosomalen 23S RNS durch Saccharosegradienten-Zentrifugation

Zur Gewinnung von intakter 23S RNS, die später bei Rekonstitutionsversuchen eingesetzt werden kann, kam die Saccharosegradienten-Zentrifugation zur Anwendung.

Die bei der Phenolextraktion von 50S Untereinheiten erhaltene 23S RNS und 5S RNS konnten mit dieser Methode getrennt werden. Etwa 200 A_{260} Einheiten RNS (2 ml) wurden pro Becher eines Spinco SW 27 aufgetragen, der mit einem linearen 5 bis 20 %igen Saccharosegradienten in TMA II gefüllt war (34 ml). Es wurde bei 4°C für 17 Stunden bei22 000 U.p.M. zentrifugiert. Nach dem Vereinigen der entsprechenden RNS-Fraktionen wurde für 4 Stunden bei mehrmaligem Wechsel des Puffers gegen TMA I dialysiert und anschließend die RNS mit Alkohol gefällt.

Ein ähnliches Gradientenprofil ist im Abschnitt 4.2.2. Abb. 14 wiedergegeben ,wobei A den 5S RNS- und B den 23S RNS-Gipfel darstellt.

3.5. Extraktion von ribosomalen Proteinen

3.5.1. Essigsäureextraktion

Die ribosomalen Proteine wurden von der RNS durch Essigsäureextraktion getrennt (HARDY et al. 1969). Die rekonstituierten RNS-Protein-Komplexe oder die ribosomalen Untereinheiten wurden in Lösungen auf 0,1 M Magnesiumchlorid gebracht, mit dem zweifachen Volumen Eisessig versetzt und bei 0°C für 40 Minuten gerührt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 10 000 U.p.M. zentrifugiert, um die ausgefallene RNS zu entfernen. Der Überstand wurde dann für 3 Stunden gegen 20 %ige und über Nacht gegen 5 %ige Essigsäure dialysiert. Die in der 5 %igen Essigsäure befindlichen Proteine wurden lyophillisiert und

für die zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet (3.6.1.).

Die zu Rekonstitutionsversuchen verwendeten Einzelproteine befanden sich in 2 %iger Essigsäure. Nach dem Lyophillisieren wurde der Rückstand in 6 M Harnstofflösung aufgenommen. Es folgte eine Dialyse über 2 x 45 Minuten gegen das 500fache Volumen von TM 4-Puffer. Anschließend wurde unter Zusatz von 0,05 % Essigsäure zu TM 4-Puffer nochmals die Dialyse wiederholt. Die Proteine wurden bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt.

3.5.2. Extraktion von 50S Untereinheiten mit Harnstoff und Lithiumchlorid

Zu einer Lösung aus 8 M Harnstoff und 4 M Lithiumchlorid wurden gleiche Volumina einer 50S Ribosomenlösung (500 A_{260} pro ml) zugegeben. Innerhalb von 48 Stunden dissoziierten die ribosomalen Proteine von der 23S RNS und 5S RNS (NOMURA und ERDMANN 1970). Im Gegensatz zu Bac. stearothermophilus fielen bei E. coli die 23S RNS und 5S RNS quantitativ aus und konnten nach 10 Minuten bei 8 000 U.p.M. abzentrifugiert werden. Das RNS-Sediment wurde als URNA 50 bezeichnet, die im Überstand befindlichen Proteine als UTP 50.

Aus URNA 50 konnte durch Sephadex G-100 Gelfiltration die 5S RNS gewonnen werden (3.4.2.).
UTP 50 hingegen wurde gegen TR-Puffer dialysiert und anschließend für Rekonstitutionsversuche verwendet (3.7.1.).

Die Proteinmenge wurde in Äquivalent-Einheiten (Ä.E.) angegeben. 1 Ä.E. gab jene Menge Protein an, die aus 1 A_{260} Einheit Ribosomen erhalten wurde.

3.6. Elektrophoresen

3.6.1. Zweidimensionale Elektrophoresen von ribosomalen Proteinen

Die Proteine konnten mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese von KALTSCHMIDT und WITTMANN (1970) aufgetrennt werden.

1,0 - 1,5 mg Protein der 50S Untereinheit bzw. 0,8 - 1,2 mg Protein der 30S Untereinheit wurden aufgetragen. Die Auftrennung nach Nettoladungen erfolgte in der 1. Dimension bei pH 8,6 in einem 8 %igen Acrylamidgel. In der 2. Dimension war die Trennung durch die Molekülgröße bestimmt. Bei pH 4,6 wurde ein 18 %iges Acrylamidgel genommen. Die Gelplatten wurden mit Amidoschwarz (0,5 % Amidoschwarz, 5 % Essigsäure) für 5 Minuten gefärbt, anschließend unter fließendem Wasser für wenige Stunden gespült und danach mit 1 %iger Essigsäure weiter entfärbt.

Für Proben, die nur eine geringe Proteinmenge enthielten, wurde die Methode der zweidimensionalen Elektrophorese im Mikromaßstab verwendet (LIN, COLLATZ und WOOL 1976). Diese Mikro-2D-Methode ist dann in unserer Arbeitsgruppe modifiziert worden (PROKOPH und ERDMANN 1976, unveröffentlichte Ergebnisse). Für eine gute Auftrennung reichte der Auftrag von etwa 1 µg pro Protein aus.

3.6.2. SDS-Gel-Elektrophorese

Als weitere Methode zur Identifizierung von Proteinen wurde die SDS (Sodiumdodecylsulfat)-Gel-Elektrophorese verwendet (WEBER und OSBORNE 1969).

Die Auftrennung erfolgte nach Molekülgröße. Diese Elek-

trophorese diente zur Reinheitsprüfung der Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu.

3.6.3. Polyacrylamidgel-Elektrophorese von ribosomaler RNS

Die 5S RNS und die 23S RNS wurden mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf ihre Reinheit untersucht (PEACOCK und DINGMANN 1967).

Für eine gute Trennung wurde eine kombinierte Gelelektrophorese aus 3,1 %igem und 12,5 %igem Acrylamid (3.1.1.) benutzt. Das 3,1 %ige Obergel und das 12,5 %ige Untergel waren jeweils 4,5 cm lang. Die RNS-Probenlösung wurde zur besseren Trennung mit einer 5 %igen Saccharoselösung versetzt und auf die Gele aufgetragen. Bromphenolblau diente als Farbmarkierung. Die Elektrophorese (2 mA pro Gel) wurde beendet, wenn der Marker das Ende der Gele erreicht hatte. Die Gele wurden 45 Minuten lang in 0,1 % Toluidinblau und 1 % Essigsäure angefärbt und anschließend 3 Stunden in 5 Liter 5 %iger Essigsäure entfärbt.

Um auszuschließen , daß die Nukleotidkette nicht fragmentiert war, wurde die RNS-Probe ebenfalls in einer Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (3.1.1.) untersucht (JORDAN 1971).

3.6.4. Polyacrylamid-Plattengel-Elektrophorese von ribosomaler RNS

3,2 %ige und 10 %ige Polyacrylamid- bzw. Harnstoff-Polyacrylamid-Plattengele wurden zur Trennung der RNS benutzt (ZIMMERMANN 1975).

Die RNS-Proben wurden vor dem Auftragen mit einer

20 %igen Saccharose-Bromphenolblau-Lösung versetzt. Danach wurden die Proben in die im Gel eingelassenen Öffnungen mit einer feinen Kapillare einpipettiert. Nach dem Ende der Elektrophorese wurde das Gel mit Parafilm umwikkelt. Sollten ^{32}P markierte 5S RNS autoradiographisch identifiziert werden, so wurde je nach Stärke der radioaktiv markierten 5S RNS für mehrere Stunden ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt. Nachdem der Röntgenfilm entfernt und entwickelt wurde, konnte im Autoradiogramm die 5S RNS gezeigt werden. Die Färbung und Entfärbung des Gels wurde wie unter 3.6.3. geschrieben ausgeführt.

3.7. Präparation von RNS-Protein-Komplexen

3.7.1. Rekonstitution des 5S RNS-Protein-Komplexes von E. coli [5S] (HORNE und ERDMANN 1972)

Wie in Abschnitt 3.5.2. beschrieben, war die Proteinfraktion UTP 50 von E. coli frei von jeglicher RNS. Nach der Dialyse von UTP 50 gegen TR-Puffer (9 Stunden; 3 x Wechseln des Puffers), waren Proteine ausgefallen, die für 10 Minuten bei 10 000 U.p.M. abzentrifugiert wurden. Die 5S RNS-Lösung (3.4.2.) wurde auf 30 mM Tris-HCl, 20 mM $MgCl_2$ gebracht. Um für die Rekonstitution die native bzw. die renaturierte Konformation der 5S RNS einzusetzen, wurde die RNS-Lösung für 5 Minuten auf 60°C erhitzt und dann langsam bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde die RNS-Lösung auf 320 mM KCl gebracht.

Zu 100 Ä.E. UTP 50 wurden 3,5 A_{260} Einheiten 5S RNS von E. coli gegeben, vermischt und für 12 Stunden bei 0°C inkubiert. Eine weitere Fällung von Proteinen trat auf, die dann abzentrifugiert wurde.

Der 5S RNS-Protein-Komplex wurde nun von den ungebundenen

Proteinen getrennt. Die Probelösung wurde auf einen Saccharosegradienten gegeben (in TR-Puffer), der aus verschieden konzentrierten Saccharoselösungen bestand. Jeder Becher eines Spinco SW 27 wurde zunächst mit 14 ml 50 %iger und dann mit 2 ml 20 %iger Saccharoselösung gefüllt. Darüber wurden 20 ml eines linearen 5-15 %igen Saccharosegradienten aufgetragen. Die Zentrifugation bei $4^{o}C$ und 25 000 U.p.M. dauerte 60 Stunden. Der mit einem Isco-Density Gradient Fractionator isolierte 5S RNS-Protein-Komplex wurde gesammelt und gegen TR-Puffer dialysiert. Nachdem die Lösung frei von Saccharose war, wurde die Probe in Aquacide II bei $4^{o}C$ konzentriert. Das Volumen wurde bestimmt, A_{260} und A_{280} gemessen und die Probe bei $-80^{o}C$ aufbewahrt.

Zur Charakterisierung der Bindungsproteine wurde eine Essigsäureextraktion (3.5.1.) und eine zweidimensionale Elektrophorese (3.6.1.) durchgeführt.

3.7.2. Rekonstitution des vergrößerten RNS-Protein-Komplexes E. coli [23S+5S]

Der 5S RNS-Protein-Komplex (3.7.1.), aufgereinigte 23S RNS (3.4.3.) und isolierte Einzelproteine der 50S Untereinheit von E. coli wurden für die Rekonstitution benutzt.

Im Rekonstitutionsansatz wurden die einzelnen Komponenten in äquimolaren Mengen zusammengegeben. Das Gesamtvolumen berechnete sich aus der Anzahl der Versuchsansätze. Pro Ansatz wurden 0,06 A_{260} Einheiten des 5S RNS-Protein-Komplexes verwendet. Nachdem die Komponenten zusammengegeben waren, wurden im ersten Abschnitt der Rekonstitution die Probe 3 Stunden bei $0^{o}C$ gegen TR-Puffer dialysiert. Danach fand eine Dialyse gegen den gleichen Puffer für 20 Minuten bei $40^{o}C$ und für 20 Minuten bei $0^{o}C$

statt. Daran schloß sich für 3 Stunden bei $0^{o}C$ eine Dialyse gegen TMA I-Puffer an.

Auf einem 5-20 %igen Saccharosegradienten in TMA I wurde dann im Spinco SW 40-Rotor für 14 Stunden bei 22 000 U.p.M. zentrifugiert und der Gradient mit dem Isco Density Gradient Fractionator geerntet. Die Fraktionen mit dem [23S+5S] wurden gesammelt und für 3 Stunden bei dreimaligem Wechsel gegen Puffer EC dialysiert. Diese Probe konnte dann sofort für die Versuchsansätze benutzt werden.

3.8. Funktionsuntersuchungen

Die Tests, die zur Überprüfung der biologischen Aktivität der Ausgangssubstanzen herangezogen wurden, sind hier nur kurz beschrieben, da Einzelheiten aus den Literaturangaben zu entnehmen sind.

In dem Poly-(U) abhängigen Poly-Phenylalanin Einbau-Test (MATTHAEI und NIRENBERG 1961) wurde Poly-(U) als künstliche mRNS von 70S Ribosomen in Gegenwart von Enzymen und mit ^{14}C markierten Phenylalanin beladenen tRNS-Molekülen abgelesen. Die Menge der ^{14}C markierten synthetisierten Peptide stellte ein Maß für die Aktivität der Ribosomen dar.

In einem anderen Testsystem wurde das Poly-(U) durch den E. coli Phagen f_2 ersetzt (TRAUB et al. 1971). In diesem Test wurde ^{14}C markiertes Valin benutzt, da auf dem f_2-Messenger am häufigsten für Valin codiert wird.

Die Aktivität der Ribosomen wurde durch die enzymatische Bindung von fMet-tRNS am Ribosom bestimmt (DUBNOFF und MAITRA 1971). AUG, als künstliches Initiationscodon, wur-

de mit Hilfe von Initiationsfaktoren an die 70S Ribosomen gebunden; dasselbe gilt für die ^{3}H markierte Initiations-tRNS.

Die enzymatische Bindung von Phe-tRNS^{Phe} am Ribosom (RAVEL und SHOREY 1971) gab Aufschluß über die Aktivität des Elongationsfaktors EF-Tu. In diesem Test wurde Poly-(U) an 70S Ribosomen angelagert und beladene tRNS-Moleküle mit EF-Tu und GTP an die Ribosomen gebunden.

3.8.1. Bestimmung der ATPase und GTPase-Aktivitäten

Die Methode zur Bestimmung der EF-G abhängigen GTPase von PARMEGGIANI (1971) war Grundlage für alle ATPase- und GTPase-Untersuchungen. Die spezifischen Temperatur-, Zeit-, Ionen- und Substratbedingungen für die enzymatischen Aktivitäten des 5S RNS-Protein-Komplexes waren der Arbeit von GAUNT-KLOEPFER und ERDMANN (1975) entnommen.

Die Bestimmung der ATP-Hydrolyse wurde wie folgt ausgeführt: 0,06 A_{260} Einheiten 5S RNS-Protein-Komplex (72 pMol) wurden in Gegenwart von 0,16 mM ($\gamma^{32}P$)ATP (1-5 Ci/Mol) für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen war 100 bzw. 200 µl und setzte sich aus Puffer EC zusammen.

Die Pufferbedingungen waren im GTPase-Test dieselben. Es wurden in 100 bzw. 200 µl Puffer EC ebenfalls 0,06 A_{260} Einheiten 5S RNS-Protein-Komplex bei einer ($\gamma^{32}P$)GTP-Konzentration von 0,022 mM (1-5 Ci/Mol) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und mit 100 µl 1 M Perchlorsäure in 2,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat versetzt. Das durch die Hydrolyse von ATP bzw. GTP freigesetzte anorganische Phosphat (Pi)

konnte von dem nicht hydrolysierten ATP bzw. GTP auf folgende Weise getrennt werden.

500 µl einer 6 %igen Aktivkohlesuspension (Norit 40 mg/ml, HCl gewaschen) wurden zu der Lösung gegeben und mit einem Vortex für 2 Minuten gut vermischt, jeweils 3 mal mit 10 Minuten Pause. Danach wurde für 5 Minuten zentrifugiert. 0,5 ml Aliquote des Überstandes wurden in 5 ml Bray's Szintillationsflüssigkeit (3.1.1.) gezählt.

3.8.2. Bestimmung der Synthese von MS I und MS II

Die Versuchsanordnung für die Synthese von Guanosin Tetraphosphat (MS I) und Guanosin Pentaphosphat (MS II) wurde von RICHTER et al. (1974) übernommen. Anstelle der 50S und 30S Untereinheiten wurden 0,035 A_{260} Einheiten [5S] und 0,1 A_{260} Einheiten [23S+5S] eingesetzt. Die Polyphosphate wurden analytisch durch Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie nachgewiesen (CASHEL und KALBACHER 1970). Die radioaktiven Flecken wurden ausgeschnitten und in Bray's Szintillationsflüssigkeit gezählt. Die Umwandlung von (α^{32}P) GTP in ppGpp und pppGpp wurde in Prozent angegeben (HASELTINE et al. 1972).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. Der spezifische 5S RNS-Protein-Komplex von E.coli [5S] (HORNE und ERDMANN 1972)

4.1.1. Charakterisierung des [5S] -Komplexes

Für die Rekonstitution des 5S RNS-Protein-Komplexes sollte die 5S RNS in der nativen Form verwendet werden. Um eventuell denaturierte 5S RNS zu renaturieren, wurde die 5S RNS-Lösung für 5 Minuten auf 60°C erhitzt und dann langsam bei Raumtemperatur abgekühlt.

Eine ^{32}P markierte 5S RNS (ZIMMERMANN 1976) ist der gleichen Behandlung unterzogen worden. Ein Gemisch der 5S RNS und der ^{32}P markierten 5S RNS zeigte in der Plattengel-Elektrophorese (3.6.4.) nur eine Bande, die ebenfalls autoradiographisch nachgewiesen werden konnte.

Nach der Rekonstitution und der anschließenden Zentrifugation im Saccharosegradienten konnte der 5S RNS-Protein-Komplex mit einem Dichtegradienten-Fraktionator isoliert werden. Die einzelnen Fraktionen wurden dann in Bray's Szintillationsflüssigkeit gezählt. Das Profil eines solchen Gradienten ist in Abb. 11 wiedergegeben.

Da das spezifische Gewicht der freien Proteine geringer war als das der Saccharoselösung, konnten die ungebundenen Proteine nicht in die Saccharoselösung eindringen.

Der 5S RNS-Protein-Komplex hingegen konnte bei einer Konzentration von etwa 10 A_{260} pro ml nachgewiesen werden. Sein Absorptionsverhältnis A_{260}: A_{280} betrug 2 : 1, das der Proteine hingegen 1 : 2. Dadurch konnte festgestellt werden, ob an der 5S RNS Proteine gebunden waren. Die ^{32}P-Zählung zeigte den fast vollständigen Einbau der ^{32}P-markierten 5S RNS (Abb. 14, S. 50). Die Ausbeute an 5S RNS-Protein-Komplex betrug 50-70 %. Diese Angabe bezieht sich auf die Menge eingesetzter 5S RNS.

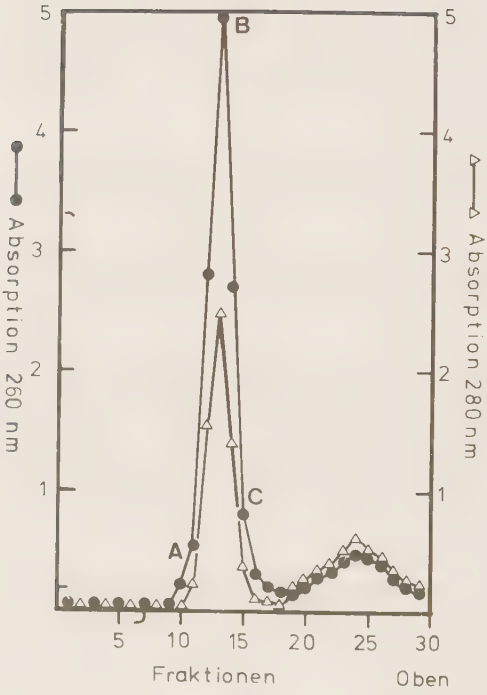


Abb. 11: Gradientenprofil des 5S RNS-Protein-Komplexes von E.coli

A = Fraktionen 10, 11 und 12

B = Fraktion 13

C = Fraktionen 14, 15 und 16

Angaben zum Gradienten siehe Text

4.1.2. Identifizierung des [5S]-Komplexes

HORNE und ERDMANN (1972) konnten in früheren Untersuchungen des 5S RNS-Protein-Komplexes von Bac. stearothermophilus feststellen, daß außer den beiden spezifischen Bindungsproteinen B-L5 und B-L22 weitere Proteine an der 5S RNS gebunden hatten. Ähnliche Befunde sind bei Untersuchungen des 5S RNS-Protein-Komplexes von E. coli in dieser Arbeit gemacht worden.

Unter der Verwendung der sehr sensitiven zweidimensionalen Elektrophorese im Mikromaßstab (3.6.1.) war es möglich, neben den drei 5S RNS Bindungsproteinen von E. coli, L5, L18 und L25, noch Spuren weiterer 50S Proteine an den 5S RNS zu identifizieren. Am häufigsten traten die Proteine L2, L7/L12 und L24 auf. Weniger vertreten waren L1, L3, L10, L17 und L19. Sehr schwach waren noch L6, L27 und L30 feststellbar. Von den Proteinen L1, L2, L3, L6, L17 und L24 war bekannt, daß es Bindungsproteine der 23S RNS sind (GARRETT et al. 1974). Bei den Angaben über die genannten Proteine handelt es sich um Durchschnittswerte aus den verschiedenen 5S RNS-Protein-Komplex-Präparationen.

Der Bereich des 5S RNS-Protein-Komplexes wurde in die Abschnitte A, B und C unterteilt, so daß man diese einzelnen Fraktionen gegenüber dem nicht unterteilten [5S]-Komplex auf ihre Proteinzusammensetzung in der zweidimensionalen Elektrophorese vergleichen konnte. Bemerkenswert war die Tatsache, daß in der Fraktion A außer den Proteinen L18 und L25 kein weiteres enthalten war. In der Fraktion C kamen nur die Proteine L10 und L7/L12 vor. Die Gipfelfraktion B enthielt neben L5, L18 und L25 die meisten anderen Proteine.

Abb. 12 zeigt die Proteine eines nicht-unterteilten 5S RNS-Protein-Komplexes von E.coli. Während in dieser Prä-

paration die Proteine L10 und L7/L12 nicht vorkommen, war das Protein L24 besonders stark vertreten.

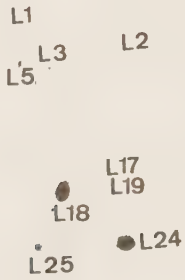


Abb. 12: Zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Mikromaßstab (3.6.1.) einer Präparation des 5S RNS-Protein-Komplex von E. coli

Angaben siehe Text

4.2. Der um 23S RNS und Proteinen der 50S Untereinheit vergrößerte RNS-Protein-Komplex von E. coli [23S+5S]

4.2.1. Charakterisierung des [23S+5S]-Komplexes

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß die Proteine L5, L18 und L25 gemeinsam (HORNE und ERDMANN 1972) sowie einzeln (GRAY et al. 1973; YU und WITTMANN 1973) an die 5S RNS binden. Ferner konnten in Gegenwart von L18 und L5, L6 oder L25 Komplexe gebildet werden, die 5S RNS und 23S RNS enthielten (GRAY et al. 1972; 1973). Unlängst wurde festgestellt, daß erst in Anwesenheit von L18 die Proteine L5 bzw. L25 an die 5S RNS binden (ZIMMERMANN 1976).

Wurde der 5S RNS-Protein-Komplex mit RNase behandelt, so konnte eine geschützte Nukleotidsequenz auf der 5S RNS um Position 80 nachgewiesen werden. Es wird daher vermutet, daß hier die 5S RNS mit der 23S RNS basengepaart ist (HERR und NOLLER 1975).

Es ist bekannt, daß 11 Proteine der 50S Untereinheit von E. coli direkt und spezifisch mit der 23S RNS in Wechselwirkung treten. Es sind dies: L1, L2, L3, L4, L6, L13, L16, L17, L20, L23 und L24 (STÖFFLER et al. 1971; SPIERER, ZIMMERMANN und MACKIE 1974). Die Proteine konnten hinsichtlich ihrer Bindungsstöchiometrie in zwei Klassen unterteilt werden (GARRETT et al. 1974). L1, L2, L3, L13, L20, L23 und L24 ergaben Komplexe mit der 23S RNS mit einem molaren RNS : Protein Verhältnis von etwa 1 : 1. Bei L4, L6, L16 (und in besonderen Fällen auch bei L2) war die Bindung zur 23S RNS schon bei einem Verhältnis von 0,2-0,3 : 1 abgesättigt.

Für die Rekonstitution des [23S+5S]-Komplexes wurden die Proteine in einem molaren Verhältnis zur RNS von 1 : 1 eingesetzt.

Der [23S+5S]-Komplex bestand aus:
L1, L2, L6, L13, L16, L17, L20, L24 und L10, L11, L7/L12.

Die vier letzten Proteine sind zwar keine 23S RNS-Bindungsproteine, sie sind jedoch für die Bindung von EF-G von Wichtigkeit. Dies geht aus folgenden Versuchen hervor:

Von L7/L12 ist bekannt, daß diesen beiden Proteinen für die Bindung der beiden Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu eine Schlüsselrolle zukommt (KISCHA et al. 1971; HAMEL und NAKAMOTO 1972; WEISSBACH et al. 1972; SOPORI und LENGYEL 1972; SANDER et al. 1972). Die Gegenwart von L7/L12 ist im 50S Ribosom erforderlich für die Elongationsfaktor abhängigen GTP-Hydrolysen, der Translokation und der enzymatischen tRNS-Bindung. Quervernetzungsversuche von EF-G mit der 50S Untereinheit von E. coli zeigten, daß die Proteine L7/L12 an oder in der Nähe der EF-G Bindungsstelle des Ribosoms lokalisiert sein müssen (ACHARYA et al. 1973).

Durch Rekonstitutionsversuche konnte ferner gezeigt werden, daß auch L10 für die EF-G abhängige GTP-Hydrolyse wichtig ist (SCHRIER et al. 1973). Verminderte GTPase-Aktivität in "core"-Partikeln kann nämlich durch Zugabe von L10 wiederhergestellt werden. In Abwesenheit von L10 wird die acetylierte Form von L7 nur sehr schwach an der 50S Untereinheit gebunden. Erst durch die Gegenwart von L10 wird eine starke Bindung von L7 an das Ribosom ermöglicht. Diese Befunde unterstützen die Vermutung, daß L10 in engem räumlichen Zusammenhang mit L7/L12 steht.

Das Protein L11 ist als Bestandteil des Peptidyltransferase-Zentrums bekannt (NIERHAUS und MONTEJO 1973). Darüber hinaus konnten MAASSEN und MÖLLER 1974 mit der Methode der Affinitätsmarkierung L11 als eines der Proteine identifizieren, die an der Bindung von GDP an das Ribosom involviert sind. Diese Befunde gaben Grund zu der

Hypothese, daß das Peptidyltransferase-Zentrum mit dem GTPase-Zentrum benachbart sein könnte.

Bei der Identifizierung des spezifischen 5S RNS-Protein-Komplexes (4.1.2.) sind neben den drei bekannten 5S RNS-Bindungsproteinen ebenfalls L10 und $L^7/L12$ nachgewiesen worden. Die Wechselwirkung dieser Proteine mit dem 5S RNS-Protein-Komplex könnte bedeuten, daß sie auch im Ribosom in unmittelbarer Nachbarschaft stehen.

4.2.2. Identifizierung des [23S+5S]-Komplexes

Wie unter 3.7.2. beschrieben, wurde die Rekonstitution mit dem 5S RNS-Protein-Komplex, 23S RNS und den oben genannten Einzelproteinen durchgeführt. Das Profil des vergrößerten Komplexes nach einer Saccharosegradienten-Zentrifugation ist in Abb. 13 wiedergegeben. Die Fraktionen mit dem [23S+5S]-Komplex wurden nach der entsprechenden Weiterbehandlung für die Versuchsansätze bereitgestellt.

Um die Bindung der 5S RNS bzw. des 5S RNS-Protein-Komplexes an 23S RNS nachzuweisen, wurde die Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von ribosomaler RNS (3.6.3.) benutzt. Neben der 23S RNS-Bande wurde im Probengel ebenfalls eine stärkere Bande in einem Bereich von 120 Nukleotiden sichtbar. Diese Bande konnte als 5S RNS-Bande identifiziert werden, da die auf einem zweiten Gel zum Vergleich aufgetragene 5S RNS die gleiche Mobilität im Gel aufwies.

Dieser Befund wurde noch durch eine andere Methode bestätigt. Eine ^{32}P-markierte 5S RNS wurde in einem 5S RNS-Protein-Komplex eingebaut (4.1.). Dieser radioaktiv markierte 5S RNS-Protein-Komplex wurde mit der 23S RNS und den isolierten Einzelproteinen rekonstituiert (3.7.2.).

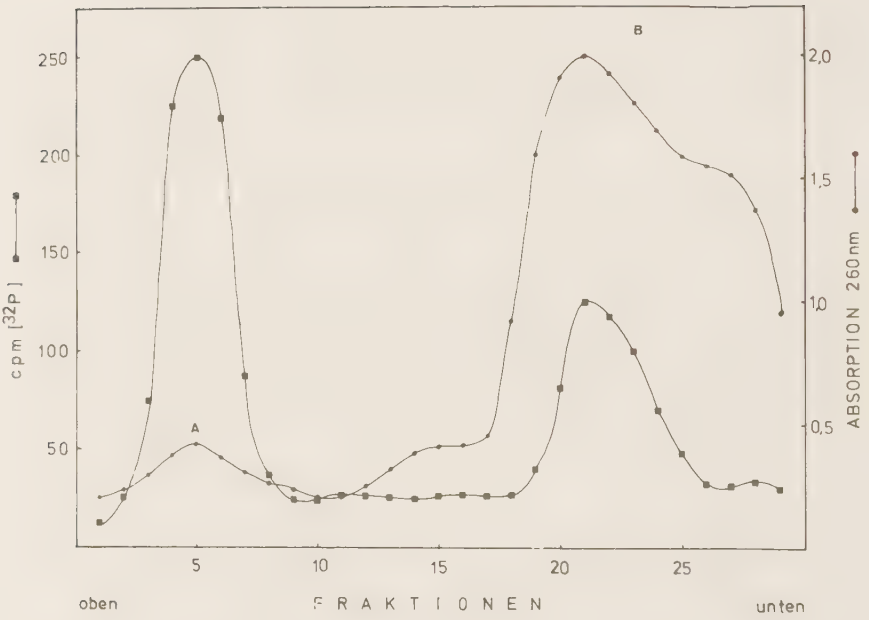


Abb. 13: Profil des vergrößerten [23S+5S]-Komplexes nach der Saccharosegradienten-Zentrifugation

A = [5S]-Komplex

B = [23S+5S]-Komplex

Nach dem Fraktionieren des Saccharosegradienten wurden die Proben mit Bray's Szintillationsflüssigkeit gezählt. Die in Abb. 13 wiedergegebene Kurve zeigt die Bindung von ^{32}P markiertem 5S RNS-Protein-Komplex an die 23S RNS. Wird die Gesamtmenge des eingesetzten radioaktiven Materials gleich 100 % gesetzt, so binden etwa 30 % des 5S RNS-Protein-Komplexes an die 23S RNS.

Um die Spezifität dieser Bindung zu bestätigen, wurden folgende Versuche durchgeführt: Unter den oben beschriebenen Rekonstitutionsbedingungen wurde ^{32}P-markierte 5S RNS jeweils mit 23S RNS und 16S RNS zusammen gegeben. Zur Kontrolle wurde anstelle der 5S RNS noch ^{32}P-markierte tRNS eingesetzt und versucht, sie mit einer der beiden großen ribosomalen RNS zu rekonstituieren. Die anschließende Saccharosegradienten-Zentrifugation wurde mit einem SW 40 für 14 Stunden bei 22 000 U.p.M. durchgeführt. Danach wurde das Gradientröhrchen von unten angestochen und die Lösung in Gläschen gesammelt. Aus der Abb. 14 ist zu ersehen, daß unter den oben genannten Rekonstitutionsbedingungen die 5S RNS nicht an die 23S RNS bindet. Es ist ebenfalls keine Bindung der 5S RNS mit der 16S RNS und der tRNS mit der 23S RNS bzw. 16S RNS festzustellen.

Diese Befunde ließen den Schluß zu, daß nur unter bestimmten Bedingungen der 5S RNS-Protein-Komplex und weitere ribosomale Proteine der 50S Untereinheit mit der 23S RNS einen vergrößerten Komplex, den [23S+5S]-Komplex bilden können.

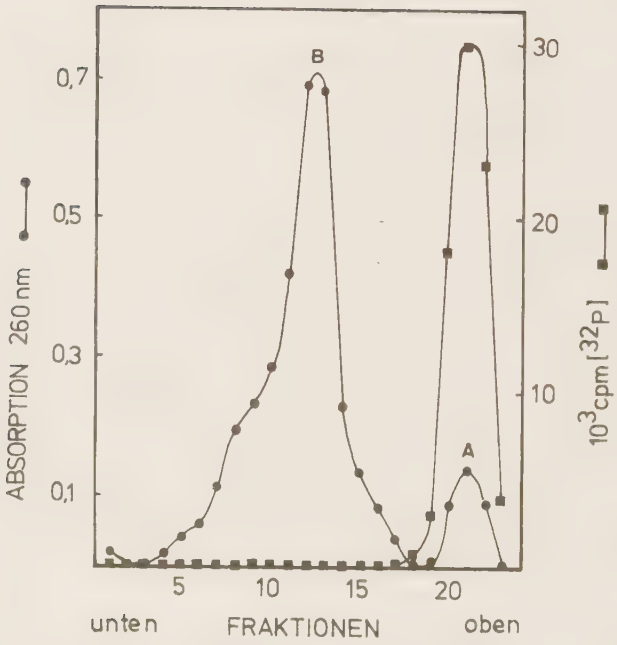


Abb. 14: Gradientenprofil nach versuchter Rekonstitution der 23S RNS mit einer ^{32}P-markierten 5S RNS

A = 5S RNS
B = 23S RNS

4.3. Untersuchungen der GTPase und ATPase-Aktivitäten

Wie unter 1.4. beschrieben, wiesen die 5S RNS-Protein-Komplexe von Bac. stearothermophilus, E. coli und Rattenleber hydrolytische Aktivitäten von ATP und GTP auf, die unabhängig vom Elongationsfaktor EF-G waren. Kinetische Untersuchungen an Bac. stearothermophilus- und Rattenleber-Komplexen ließen vermuten, daß die Hydrolyse von ATP und GTP an zwei verschiedenen Stellen des Komplexes stattfindet (HORNE und ERDMANN 1973; GRUMMT et al. 1974).

4.3.1. Bestimmung der ribosomalen ATPase und GTPase-Aktivität von einzelnen ribosomalen Proteinen, des [5S]-Komplexes und des [23S+5S]-Komplexes

Die Hydrolyse von ATP bzw. GTP wurde mit der unter 3.8.1. beschriebenen Methode bestimmt. Bevor Vergleiche zwischen den enzymatischen Aktivitäten der beiden Komplexe aufgestellt wurden, erstreckten sich die ersten Untersuchungen auf die ATPase und GTPase-Aktivitäten einzelner Proteine.

Es wurden Proteine (z. B. L5, L18 und L25) untersucht, von denen zu vermuten war, daß sie an der ATP- und GTP-Aktivität des 5S RNS-Protein-Komplexes beteiligt sind. Diese Versuche (Abb. 15) machten deutlich, daß vor allem zwei Proteine, nämlich L5 und L18, ATP und GTP spalten können. Zwar zeigte die GTP-Hydrolyse, daß auch andere Proteine, wie z. B. L1, L2, L16 und L25, aktiv waren, doch wiesen L5 in der GTP-Hydrolyse und L18 in der ATP-Hydrolyse die höchste Aktivität auf.

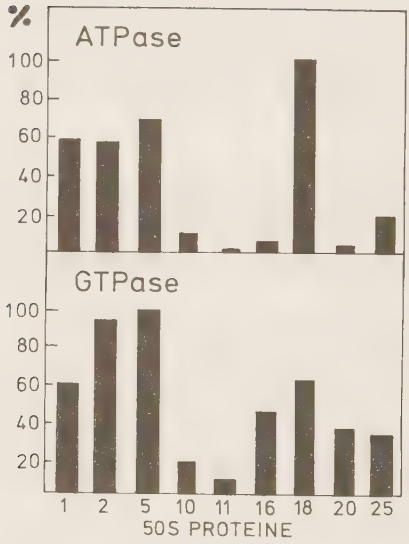


Abb. 15: ATPase und GTPase-Aktivitäten einzelner Proteine der 50S-Untereinheit von E. coli

Es werden äquimolare Mengen der Proteine für die ATP- und GTP-Hydrolyse eingesetzt (1 nMol)

100 % ATP-Hydrolyse = L18 (267 pMol ATP)
100 % GTP-Hydrolyse = L5 (163 pMol GTP)

Diese Befunde konnten durch RNS-Protein-Komplexe bestätigt werden, die nur jeweils aus der 5S RNS und einem Protein bestanden. Verglichen mit den Einzelproteinen zeigten diese um 5S RNS erweiterten Partikel eine etwas größere enzymatische Aktivität (siehe Tabelle I).

Tabelle I: ATP- und GTP-Hydrolyse von 50S Proteinen mit und ohne 5S RNS

	50 S Proteine					
	ohne 5S RNS			mit 5S RNS		
	L5	L18	L25	L5	L18	L25
ATP-Hydrolyse in c.p.m.	1080	1130	250	1390	1550	330
GTP-Hydrolyse in c.p.m.	1140	930	480	1330	1400	640

Die Proteine wurden zu der RNS in einem Verhältnis von 1 : 1 zugegeben. Eingesetzt wurden 72 pMol Protein bzw. 0,06 A_{260} Einheiten 5S RNS.

Die Untersuchungen über die enzymatischen Aktivitäten des 5S RNS-Protein-Komplexes und des um die 23S RNS vergrößerten RNS-Protein-Komplexes ließen erkennen, daß keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Komplexen bei der ATPase-Aktivität festzustellen waren.

In Übereinstimmung mit den Befunden von HORNE und ERDMANN konnte gezeigt werden, daß der 5S RNS-Protein-Komplex unabhängig von dem Elongationsfaktor EF-G GTP hydrolysiert. Aus Abb. 16 ist zu ersehen, daß der vergrößerte

Komplex [23S+5S] über fast doppelt soviel GTPase-Aktivität verfügt wie der [5S]-Komplex.

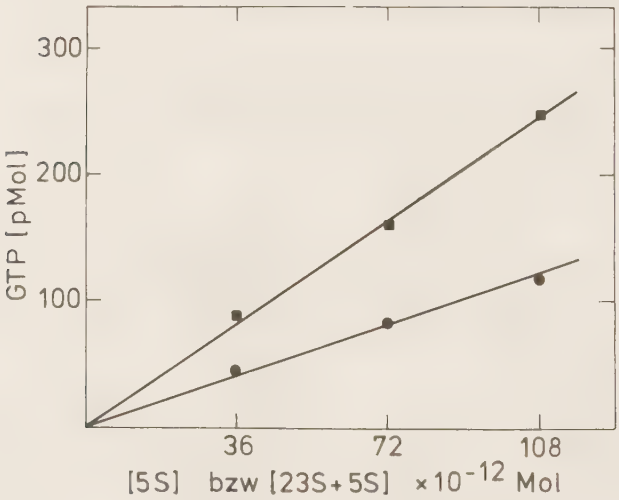


Abb. 16: Abhängigkeit der GTP-Hydrolyse von [5S] -Komplex und von [23S+5S]-Komplex

36×10^{-12} Mol ≙ 0,03 A_{260} Einheiten [5S]-Komplex (●—●)

≙ 0,88 A_{260} Einheiten [23S+5S]-Komplex (■—■)

Es ist wahrscheinlich, daß der 5S RNS-Protein-Komplex durch die Zugabe von 23S RNS und spezifischen Bindungsproteinen eine Konformationsänderung erfährt. Das kann zur Folge haben, daß das ribosomale GTPase-Zentrum besser ausgerichtet wird und deshalb GTP effektiver spalten kann.

Der von HORNE und ERDMANN (1972) gezogene Schluß, daß ATP und GTP an zwei getrennt voneinander lokalisierten Zentren im Ribosom gespalten werden, kann durch diese Ergebnisse unterstützt werden. Während der [23S+5S]-Komplex fast doppelt soviel GTP spaltet wie der [5S]-Komplex, wiesen beide RNS-Protein-Komplexe in der ATP-Hydrolyse keine signifikanten Unterschiede auf. Die vermutliche Konformationsänderung scheint das ATPase-Zentrum unbeeinflußt zu lassen.

4.3.2. Einfluß von Elongationsfaktor EF-G auf die ATPase und GTPase Aktivität des [5S]-Komplexes und des [23S+5S]-Komplexes

Einige Arbeitsgruppen berichteten unabhängig voneinander, daß die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G gleiche oder sich überlappende Bindungsstellen am Ribosom haben (RICHMAN und BODLEY 1972; CABRER, VAZQUEZ und MODOLELL 1972; MILLER 1972; RICHTER 1972; MODOLELL und VAZQUEZ 1973). Dieser Schluß beruht auf dem Befund, daß EF-Tu und EF-G nicht gleichzeitig am Ribosom binden können. Es muß deshalb ein Mechanismus existieren, der die Bindung der beiden Faktoren an das Ribosom reguliert. Es wurde nachgewiesen, daß die Bindungsstelle(n) sich in der Nähe der ribosomalen "A-site" befinden müssen. Die Proteine L7 und L12 sind - wie berichtet - an oder nahe diesem Ort lokalisiert.

In der Elongation wird mehrfach GTP hydrolysiert (1.1.2.). Die Spaltung von GTP ist abhängig von EF-Tu und EF-G. Von EF-Tu ist bekannt, daß dieser Faktor nur in Form des EF-Tu-Aminoacyl-tRNS-GTP-Komplexes am Ribosom bindet. Neuere Untersuchungen über die EF-Tu abhängige GTPase ließen erkennen, daß das katalytische Zentrum auf dem Elongationsfaktor selbst lokalisiert ist (WOLF et al. 1974).

Die von EF-G beeinflußte Hydrolyse von GTP findet während der Translokation statt. Obwohl ein direkter Befund noch aussteht, vermuteten SANDER und PARMEGGIANI (1976), daß die katalytisch aktive Komponente für die GTPase-Wirkung sich auf dem Elongationsfaktor EF-G befindet, ähnlich wie bei EF-Tu. Anderseits ist es ebenso wahrscheinlich, daß ribosomale Proteine (wie z. B. L5, L11, L18 und L30) direkt an der Gestaltung eines katalytischen Zentrums für die EF-G abhängige GTPase beteiligt sind (MAASSEN und MÖLLER 1974).

Im folgenden wurde der Einfluß von ansteigenden Mengen EF-G auf die ATP- und GTP-Hydrolyse untersucht. Aus Abb. 17 ist zu erkennen, daß auch der Elongationsfaktor EF-G allein ATP und GTP spalten kann. Gab man zunehmende Mengen im EF-G zu einer konstanten Menge von [5S]-Komplex dazu, so stieg die enzymatische Aktivität stark an. Die größte Aktivität wurde bei einer Konzentration von etwa 1 µg EF-G pro Ansatz erreicht. 0,06 A_{260} Einheiten des [5S]-Komplexes plus 1 µg EF-G spalteten etwa 240 pMol GTP (Abb. 17). Der Elongationsfaktor EF-G allein hydrolysierte bei einer Konzentration von 1 µg etwa 40 pMol GTP, 0,06 A_{260} Einheiten des [5S]-Komplexes ohne EF-G hingegen spalteten etwa 90 pMol GTP.

Dieses Beispiel verdeutlicht, daß der [5S]-Komplex und der Elongationsfaktor EF-G zusammen eine höhere GTPase-Aktivität besitzen (240 pMol) als die Summe der vom [5S]-Komplex und vom EF-G getrennt verursachten Aktivitäten (90 + 40 = 130 pMol). Dieser bemerkenswerte Befund war auch bei der ATP-Hydrolyse festzustellen.

Eine kooperative Wechselwirkung des 5S RNS-Protein-Komplexes mit dem Elongationsfaktor EF-G scheint nicht ausgeschlossen zu sein: Bei der Untersuchung des [5S]-Komplexes (4.1.2.) konnten in Spuren die Proteine L10

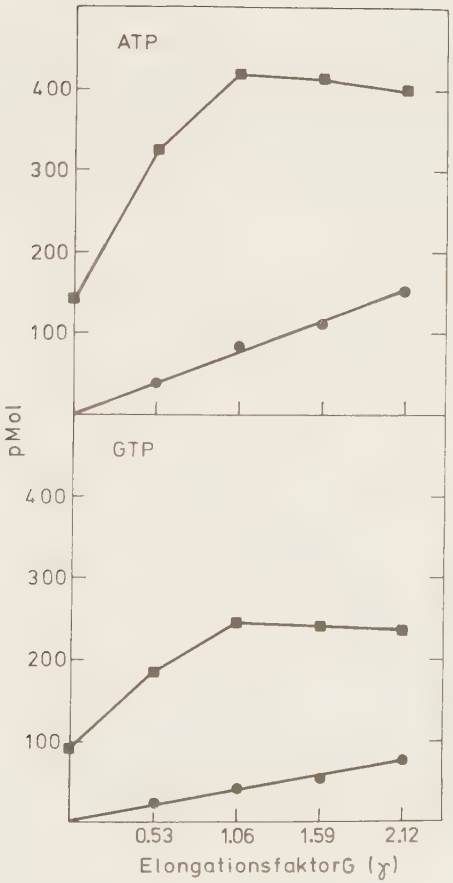


Abb. 17: Einfluß von Elongationsfaktor EF-G auf die ATP- und GTP-Hydrolyse

(●—●) = ATP- und GTP-Hydrolyse durch EF-G

(■—■) = ATP- und GTP-Hydrolyse durch den [5S]-Komplex (0,06 A_{260}) mit ansteigenden Mengen EF-G

und L7/L12 nachgewiesen werden, die bekanntlich für die Bindung des Elongationsfaktors EF-G an das Ribosom von Bedeutung sind.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden jeweils ansteigende Mengen RNS-Protein-Komplexe mit einer konstanten Menge EF-G zusammengegeben. Es sollte hierbei untersucht werden, ob sich Aktivitätsunterschiede zwischen [5S]-Komplex und [23S+5S]-Komplex bei der EF-G abhängigen GTP-Hydrolyse feststellen lassen.

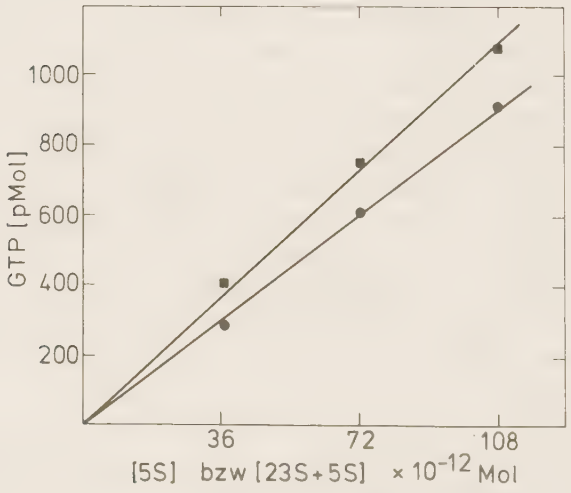


Abb. 18: Einfluß des [5S]-Komplexes und des [23S+5S]-Komplexes auf die GTP-Hydrolyse in Gegenwart von konstanter Menge EF-G

(●—●) = [5S]-Komplex + 1 µg EF-G
(■—■) = [23S+5S]-Komplex + 1 µg EF-G

Aus Abb. 18 wird deutlich, daß der vergrößerte RNS-Protein-Komplex mehr GTP hydrolysiert als der 5S RNS-Protein-Komplex. Vergleicht man die Ergebnisse aus Abb. 16 und aus Abb. 18 miteinander, so ist festzustellen, daß unter Zugabe von 1 µg EF-G beide RNS-Protein-Komplexe 4 bis 5mal soviel GTP hydrolysieren wie ohne Zusatz von EF-G. Wahrscheinlich wird durch die Anlagerung von EF-G und der damit verbundenen Konformationsänderung eine effektivere Hydrolyse des GTP erreicht.

Ferner wurde der Einfluß von EF-G auf die ATPase-Wirkung der beiden RNS-Protein-Komplexe untersucht. Eine Stimulierung der ATP-Hydrolyse konnte erreicht werden, doch ließen sich signifikante Unterschiede zwischen dem [5S]-Komplex und dem [23S+5S]-Komplex nicht feststellen.

4.3.3. Alkoholische Lösungsmittel und ihr Einfluß auf die ATPase und GTPase-Aktivitäten

Von dem 5S RNS-Protein-Komplex von Bac. stearothermophilus war bekannt, daß die ATPase und GTPase durch Äthanol und Methanol stimuliert werden (HORNE 1973). DMSO zeigte hingegen keinen Einfluß auf die Hydrolyse von ATP und GTP. Auch die EF-G abhängige GTPase in E. coli konnte von Alkoholen stimuliert werden (HAMEL und NAKAMOTO 1972).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls der Einfluß der organischen Lösungsmittel Äthanol, Methanol und DMSO auf die ATP- und GTP-Hydrolyse der verschiedenen RNS-Protein-Komplexe untersucht.

Aus Abb. 19 geht hervor, daß die ATPase-Aktivität des [5S]-Komplexes durch DMSO gehemmt wurde. Äthanol und Methanol zeigten in geringeren Konzentrationen kaum Einflüsse auf die ATPase, jedoch trat bei 40 % Anteil der beiden Lösungsmittel im Test eine starke Streuung ein.

Die GTPase hingegen wurde von allen drei Lösungsmitteln stimuliert. Durch Äthanol und Methanol wurde die Hydrolyseaktivität rasch bis zu 140 % bzw. 160 % gesteigert, fiel dann aber bei höheren Konzentrationen der beiden Lösungsmittel auf etwa 100 % wieder ab. Eine stetig ansteigende Stimulierung erfolgte durch DMSO (Abb. 19).

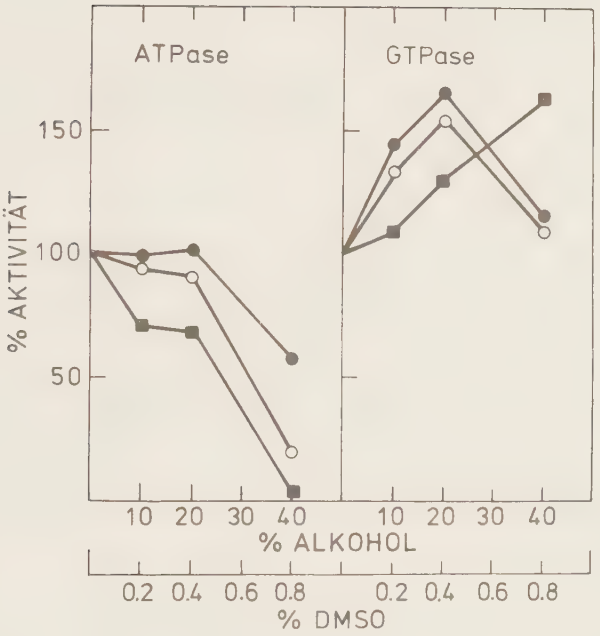


Abb. 19: Einfluß von organischen Lösungsmitteln auf die ATP- und GTP-Hydrolyse am Beispiel des [5S]-Komplexes

(○—○) = Äthanol, (●—●) = Methanol
(■—■) = DMSO

4.3.4. Antibiotika und ihr Einfluß auf die ATPase und GTPase-Aktivität

Verschiedene Antibiotika können auf die Proteinbiosynthese einwirken, dabei z. B. die ribosomale und Elongationsfaktor abhängige GTPase hemmen (LUCAS-LENNARD und LIPMANN 1971; VAZQUEZ 1974; PESTKA 1976). Einige dieser Antibiotika unterdrücken z. B. die hydrolytischen Aktivitäten des 5S RNS-Protein-Komplexes von Bac. stearothermophilus (HORNE und ERDMANN 1974). In Tabelle II sind die Antibiotika aufgeführt, dessen Einfluß auf ATP- und GTP-Hydrolyse untersucht wurde.

Tabelle II: Antibiotika und ihre Einflüsse auf die ATP- und GTP-Hydrolyse in Gegenwart des [5S]-Komplexes und des [23S+5S]-Komplexes

Antibiotika	Konzentration im Test (Σ Vol 200 µl)	Lösungsmittel	%LSGM. im Test	Einfluß auf ATPase	Einfluß auf GTPase
Althiomycin	40 µg	DMSO	0,4 %	-	-
Chloramphenicol	1 mM	Methanol	20 %	-	-
Clindamycin	1 mM	H_2O		-	-
Erythromycin	0,2-2 mM	Methanol	20 %	+	-
Streptogramin B	40 µg	Äthanol	20 %	-	-
Streptomycin	1 mM	H_2O		-	-
Tylosin	1 mM	Äthanol	20 %	-	-
Amicetin	0,5-1 mM	H_2O		-	-
Blasticidin S	1 mM	H_2O		-	-
Fusidinsäure	1-10 mM	Methanol	20 %	-	+
Puromycin	1 mM	Methanol	20 %	-	-

Die in dieser Tabelle angegebenen Antibiotika wirken auf der Ebene der Translation. Althiomycin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Tylosin, Streptogramin B und Streptomycin üben ihre Wirkung ausschließlich auf prokaryontische Systeme aus; Amicetin, Blasticidin S, Puromycin und Fusidinsäure hingegen greifen auch in die Proteinsynthese von Eukaryonten ein (VAZQUEZ 1974). Im folgenden Abschnitt wird kurz die bisher bekannte Wirkungsweise der Antibiotika erläutert.

Althiomycin blockiert die Peptidylbindung in intakten bakteriellen Systemen (BURNS und CUNDLIFFE 1973). Von Amicetin und Blasticidin S geht eine Wirkung auf das Peptidyltransferase-Zentrum aus. Beide hemmen die Bindung des Acceptorsubstrates und steigern die Bindung des Donorsubstrates (CERNA et al. 1973). Chloramphenicol interferiert spezifisch mit der 50S Untereinheit von Ribosomen. Das Protein L16 von E.coli ist vermutlich an der Chloramphenicolbindung beteiligt (PONGS et al. 1973; NIERHAUS und NIERHAUS 1973). Chloramphenicol blockiert das Aminoacyl-Ende einer aa-tRNS und verhindert damit die Transpeptidierung.

Das Antibiotikum Streptomycin greift neben der Translation auch in andere Zellprozesse ein. In der Proteinsynthese verursacht Streptomycin das sogenannte "misreading", d.h. durch falsches Ablesen der im RNS-Matrize werden funktionell unwirksame Proteine mit veränderten Aminosäurensequenzen gebildet (DAVIES, GILBERT und GORINI 1964). In der Elongation verhindert Streptomycin die Bindung der aa-tRNS in die "A-site" (LUZZATTO, APIRION und SCHLESSINGER 1969), während in der Initiation der Initiationskomplex durch das Antibiotikum unstabil wird (MODOLELL und DAVIES 1970).

Streptogramin B übt seine Wirkung auf die 50S Untereinheit aus und inhibiert die Proteinsynthese von bakteriellen Systemen (VAZQUEZ 1966).

Erythromycin wirkt auf die große Untereinheit der Ribosomen ein (FERNANDEZ-MUNOZ und VAZQUEZ 1973). Es scheint die Peptidbindung zu hemmen und die Translokation zu verhindern (TANAKA et al. 1973). Ferner wurde beobachtet, daß Erythromycin-Resistenz mit Modifikationen der 23S RNS zusammenhängen kann (LAI, WEISSBLUM, FAHNESTOCK und NOMURA 1973).

Einflüsse von Fusidinsäure sind nicht nur bei bakteriellen Systemen sondern auch bei Säugetierzellen festgestellt worden. Es ist bekannt, daß Fusidinsäure die Translokation verhindert und die EF-G abhängige GTPase blockiert (PESTKA 1968). Diese GTPase ist jedoch unbeeinflußt in Mutanten, die fusidinsäureresistent sind (BERNARDI und LEDER 1970). Die ersten Bindungsversuche mit ^{3}H markiertem Antibiotikum wiesen den Elongationsfaktor EF-G als Angriffspunkt für die Fusidinsäure aus.
In Gegenwart von Ribosomen, EF-G und GTP vermag Fusidinsäure einen stabilen Komplex zu bilden, den Fusidinsäure-GDP-Ribosom-EF-G-Komplex, der die GTP-Hydrolyse blockiert und EF-G und GDP auf dem Ribosom zurückhält (BODLEY et al. 1969; BODLEY et al. 1970). Dieser Komplex verhindert außerdem die Bindung der Aminocyl-tRNS an das Ribosom (CABRER, VAZQUEZ und MODOLELL 1972; MILLER 1972; RICHTER 1972; RICHMAN und BODLEY 1972).

Die Ergebnisse aus einer Reihe von Versuchen besagen, daß die enzymatischen Aktivitäten des [5S]-Komplexes und des [23S+5S]-Komplexes von den in der Tabelle II angeführten Antibiotika mit Ausnahme von Erythromycin und Fusidinsäure nicht oder nur unwesentlich beeinflußt wurden. Die weiteren Untersuchungen wurden deshalb ausschließlich mit den beiden Antibiotika Erythromycin und Fusidinsäure durchgeführt.

4.3.4.1. Einfluß von Erythromycin und Fusidinsäure auf die ATP-Hydrolyse

In Abb. 20 wird deutlich, daß Fusidinsäure auf die ATP-Hydrolyse beider Komplexe keine Einwirkung hat. Die ATPase-Kurven für [5S]-Komplex, Methanol und Fusidinsäure zeigten nur unwesentliche Unterschiede gegenüber denen für [5S]-Komplex und Methanol. Es waren auch keine Effekte von Fusidinsäure auf die ATP-Hydrolyse in Gegenwart des [23S+5S]-Komplexes feststellbar.

Durch Zugabe von steigenden Mengen Erythromycin wurde die ATPase-Wirkung des [23S+5S]-Komplexes gehemmt, während dies beim [5S]-Komplex nicht der Fall war. Dieses Ergebnis war insofern überraschend, als signifikante Unterschiede in der ATP-Hydrolyse bei beiden Komplexen nicht nachzuweisen waren (4.3.1.). Der spezifische Einfluß von Erythromycin auf das ATPase-Zentrum des [23S+ 5S]-Komplex konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Hier bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

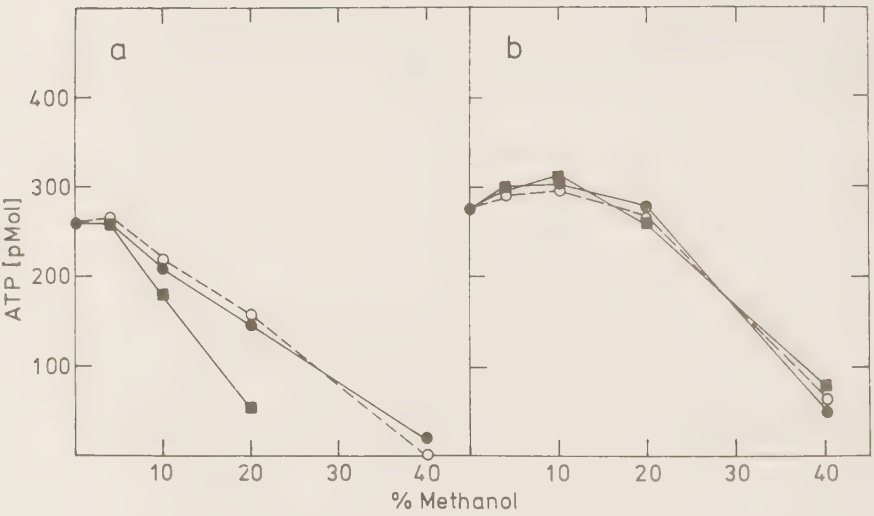


Abb. 20: Einfluß von ansteigenden Mengen Erythromycin, Fusidinsäure und Methanol auf die ATP-Hydrolyse in Gegenwart des [23S+5S]-Komplexes (a) und des [5S]-Komplexes (b)

(○--○) = Methanol, (●—●) = Fusidinsäure
(■—■) = Erythromycin
[23S+5S]-Komplex = 0,88 A_{260} Einheiten
[5S]-Komplex = 0,06 A_{260} Einheiten

Die Antibiotika sind in Methanol gelöst:
4 % Methanol ≙ 0,2 mM Erythromycin bzw. 1 mM Fusidinsäure
10 % Methanol ≙ 0,5 mM Erythromycin bzw. 2,5 mM Fusidinsäure
20 % Methanol ≙ 1,0 mM Erythromycin bzw. 5,0 mM Fusidinsäure
40 % Methanol ≙ 2,0 mM Erythromycin bzw. 10,0 mM Fusidinsäure

4.3.4.2. Einfluß von Erythromycin und Fusidinsäure auf die GTP-Hydrolyse

Es war von Interesse, ob eine Hemmwirkung von Fusidinsäure auf die EF-G abhängige GTP-Hydrolyse in Gegenwart des [5S]-Komplexes und des [23S+5S]-Komplexes festzustellen war. Ebenso war die Frage offen, welche Auswirkungen Erythromycin auf die EF-G abhängige GTPase haben würde. Die Abb. 21 gibt die Einflüsse von Erythromycin und Fusidinsäure auf die GTP-Hydrolyse in Gegenwart von EF-G wieder.

Es ist bekannt, daß die ribosomale GTPase der beiden RNS-Protein-Komplexe durch Methanol stimuliert werden kann (Abb. 19; Seite 61). Weiterhin ist festgestellt worden, daß der [5S]-Komplex und der [23S+5S]-Komplex in kooperative Wechselwirkung mit dem Elongationsfaktor EF-G treten (4.3.2.; Seite 56, 57). Eine größere GTP-Hydrolyse-Aktivität könnte auf diese Wechselwirkung zurückgeführt werden. Wird Methanol zu den RNS-Komplexen und EF-G gegeben, so ist ein Anstieg der Aktivität der EF-G abhängigen GTPase zu verzeichnen (Abb. 21 a und 21 b, ○—○). Durch die Zugabe von Erythromycin und Methanol sind keine stärkeren Effekte feststellbar (Abb. 21 a und 21 b, ■—■). Wird hingegen Fusidinsäure und Methanol zu dem Reaktionsgemisch gegeben, so führt dies zu einer signifikanten Stimulierung der GTPase-Aktivität. Dabei wird vom [23S+5S]-Komplex (Abb. 21 a, ●—●) etwas mehr GTP hydrolysiert als vom [5S]-Komplex (Abb. 21 b, ●—●).

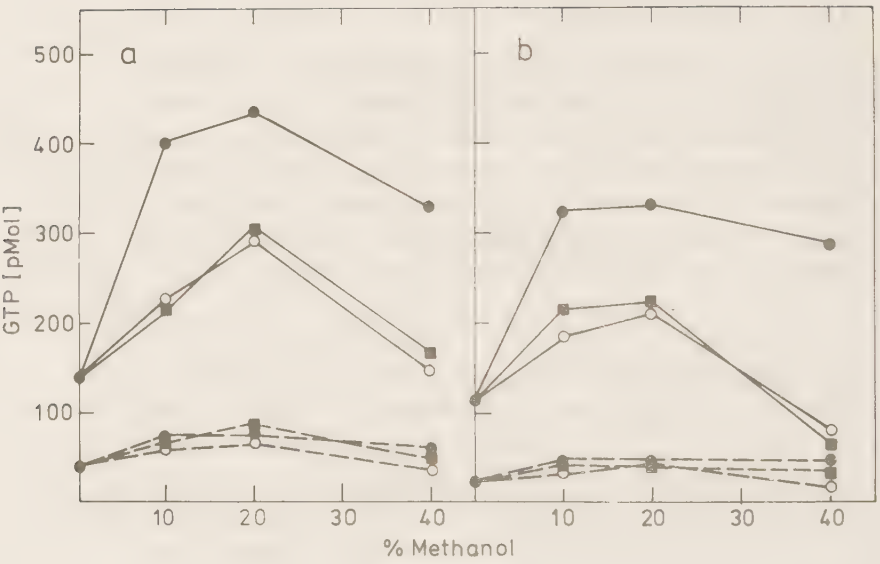


Abb. 21: Einfluß von ansteigenden Mengen Erythromycin, Fusidinsäure und Methanol auf die GTP-Hydrolyse des [23S+5S]-Komplexes (a) und des [5S]-Komplexes (b) in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Elongationsfaktors EF-G

(○—○) = Methanol mit EF-G (1 µg/200 µl Ansatz)
(○--○) = Methanol ohne EF-G
(●—●) = Fusidinsäure mit EF-G (1 µg/200 µl Ansatz)
(●--●) = Fusidinsäure ohne EF-G
(■—■) = Erythromycin mit EF-G (1 µg/200 µl Ansatz)
(■--■) = Erythromycin ohne EF-G
[23S+5S]-Komplex = 0,88 A_{260} Einheiten
[5S]-Komplex = 0,06 A_{260} Einheiten

Die Antibiotika sind in Methanol gelöst:
10 % Methanol ≙ 0,5 mM Erythromycin bzw. 2,5 mM Fusidinsäure
20 % Methanol ≙ 1,0 mM Erythromycin bzw. 5,0 mM Fusidinsäure
40 % Methanol ≙ 2,0 mM Erythromycin bzw. 10,0 mM Fusidinsäure

Es wäre möglich, daß die Fusidinsäure, EF-G und GTP sich an den RNS-Protein-Komplex anlagern. Anschließend könnte das GTP hydrolysiert werden. Fusidinsäure würde es dem Elongationsfaktor EF-G nun nicht ermöglichen, vom RNS-Protein-Komplex zu dissoziieren. Vielmehr vermag das Antibiotikum das nun entstandene GDP mit dem EF-G an den RNS-Protein-Komplex zu binden. Eine neue EF-G abhängige Hydrolyse von GTP wäre nunmehr ausgeschlossen (BODLEY et al. 1969). Ein Mol GTP könnte nur von einem Mol RNS-Protein-Komplex in Anwesenheit von EF-G gespalten werden. In diesem Falle würde Fusidinsäure einen inhibierenden Effekt auf die EF-G abhängige GTPase simulieren. Da aber bei einem Einsatz von 80 pMol RNS-Protein-Komplex bis zu 400 pMol Substrat hydrolysiert werden, folglich ein molares Verhältnis von 1 : 5 vorliegt, scheint Fusidinsäure einen anderen Wirkungsmechanismus auszulösen.

Eine Erklärung für diesen neuen Wirkungsmechanismus wäre dann gegeben, wenn an der GTP-Hydrolyse zwei sich gegenseitig beeinflussende hydrolytische Zentren beteiligt wären. Unter dieser Voraussetzung ließe sich der stimulierende Effekt der Fusidinsäure verstehen. Eine Inhibierung der EF-G abhängigen GTPase durch Zugabe von Fusidinsäure hätte eine Stimulierung der ribosomalen GTPase zur Folge.

4.4. Einfluß des "Stringentfaktors" auf die ATP- und GTP-Hydrolyse der RNS-Protein-Komplexe

Die Synthesen von Guanosintetraphosphat (ppGpp oder MS I) und Guanosinpentaphosphat (pppGpp oder MS II) werden von dem "Stringentfaktor" katalysiert. Nach der Hydrolyse von ATP wird das Pyrophosphat in die 3'-Position des GDP oder GTP transferiert (SY und LIPMANN 1973). Wird an der ribosomalen "A-site" eine codonspezifische unbeladene tRNS gebunden, so wird der "Stringentfaktor" aktiviert: MS I und MS II werden gebildet. Die Synthese wird unter-

brochen, wenn sich wieder eine beladene tRNS an das Ribosom anlagert (PEDERSEN, LUND und KJELDGAARD 1973, HASELTINE und BLOCK 1973).

Im folgenden sind Untersuchungen aufgeführt, bei denen in der unter 3.8.2. beschriebenen Versuchsanordnung anstelle der 30S und 50S Untereinheiten die verschiedenen RNS-Protein-Komplexe (40 pMol) eingesetzt wurden. Tritt der "Stringentfaktor" mit dem [5S]-Komplex bzw. [23S+5S]-Komplex in Wechselwirkung, so müßte eine Beeinflussung der ATPase- und GTPase-Aktivitäten festzustellen sein. Weiterhin wurde untersucht, ob der "Stringentfaktor" in Gegenwart der RNS-Protein-Komplexe die Synthese von MS I oder MS II katalysieren kann.

Tabelle III:

	Synthese von MS I und MS II in %		Hydrolyse von GTP in pMol		Hydrolyse von ATP in pMol	
	+S.F.	-S.F.	+S.F.	-S.F.	+S.F.	-S.F.
30S + 50S	62	6	$-^{+}$	$-^{+}$	$-^{+}$	$-^{+}$
[5S]-Komplex	1,1	0,7	76	75	52	51
[23S+5S]-Komplex	1,0	0,7	166	160	43	49

S.F. = "Stringentfaktor"
$-^{+}$ = wurde nicht getestet

Wie aus Tabelle III zu ersehen ist, wurde die Hydrolyse von ATP und GTP durch die beiden RNS-Protein-Komplexe in Gegenwart des "Stringentfaktors" nicht beeinflußt. Außerdem fand keine Synthese von ppGpp oder pppGpp in Anwesenheit des [5S]-Komplexes bzw. des [23S+5S]-Komplexes statt.

4.5. Untersuchungen von weiteren enzymatischen Aktivitäten

Wie unter 1.3. beschrieben, können Aminoacyl-tRNS oder auch unbeladene tRNS mit ihrer T-Ψ-C-G Sequenz mit der 50S Untereinheit in Wechselwirkung treten. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß diese Reaktion mit der 5S RNS in der ribosomalen "A-site" stattfindet (ERDMANN et al. 1973; RICHTER et al. 1973; RICHTER et al. 1974; SPRINZL et al. 1976).

Die tRNS im Stadium der Translation wird auch als Matrizen-tRNS bezeichnet. Sie stellt innerhalb der Biosynthese von tRNS-Molekülen das Endprodukt dar (SCHÄFER und SÖLL 1974; ALTMAN 1975). Die Vorstufen dieser Matrizen-tRNS sind die sogenannten "precursor-tRNS". Sie werden in den verschiedensten Entwicklungsschritten von Ribonukleasen bis zur Matrizen-tRNS abgebaut.

Nachdem es gelungen war, precursor-tRNS zu isolieren (ALTMAN und SMITH 1971; ROBERTSON et al. 1972), konnte gezeigt werden, daß Tyrosin-tRNS-precursor-Moleküle durch eine Ribonuklease bis zur spezifischen Tyrosin-tRNS abgebaut wurden (ALTMAN und ROBERTSON 1973).

Aus den oben genannten Gründen entwickelte sich eine Zusammenarbeit mit Dr. Altman von der Yale-University, New Haven, U.S.A., in der festgestellt werden sollte, ob die spezifischen 5S RNS-Protein-Komplexe von Bac. stearothermophilus und E. coli die Eigenschaft besitzen, precursor-tRNS zu spalten.

In einer Standard-Versuchsanordnung wurden RNasen und Substrat in TR-Puffer bei 37°C für 45 Minuten erwärmt. Dann wurde die Inkubation mit 0,4 M EDTA beendet. Anschließend wurde das Gemisch im Vakuum getrocknet, auf eine Plattengel-Elektrophorese aufgetragen (wie 3.6.4.), und die Banden wurden autoradiographisch nachgewiesen. Die Banden wurden aus dem Gel geschnitten und mit Bray's

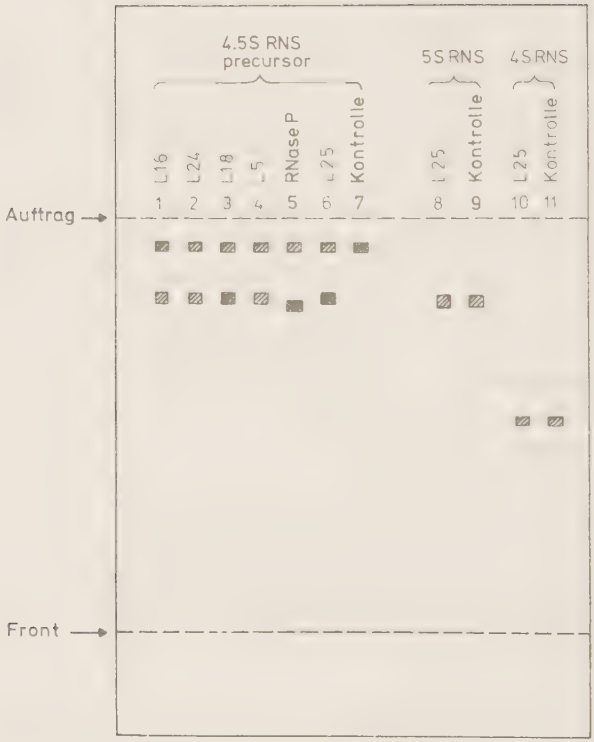


Abb. 22: Autoradiographisches Bild einer Plattengel-Elektrophorese

Linien 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 = ribosomale Proteine der 50S Untereinheit von E. coli
Linie 5 = Ribonuklease P

= schwächere Spaltprodukte
= stärkere Spaltprodukte

Szintillationsflüssigkeit gezählt.

Die ersten Befunde deuteten an, daß die 5S RNS-Proteinkomplexe von beiden Bakterien RNase-Aktivitäten zeigten. In Versuchen mit Einzelproteinen von E. coli besaßen neben den drei spezifischen 5S RNS-Bindungsproteinen L5, L18 und L25 auch andere Proteine der 50S Untereinheit eine RNase-Aktivität. Aus weiteren Untersuchungen war zu ersehen, daß es sich hierbei nicht um eine Exo- sondern um eine Endoribonuklease handelte.

In Abb. 22 ist das autoradiographische Bild einer Versuchsreihe wiedergegeben, in der verschiedene ribosomale Proteine und RNase P mit 5S RNS, 4S RNS und"4,5S precursor RNS" zusammen inkubiert wurden. Die "4,5S precursor RNS" ist die Vorstufe der tRNS und hat eine Länge von 126 Nukleotiden.Sie wird von RNase P in zwei Spaltprodukte von 106 und 20 Nukleotiden zerlegt. Aus Abb. 22 ist ersichtlich, daß eine Identität in der enzymatischen Aktivität der RNase P und der ribosomalen Proteine ausgeschlossen werden kann, da ihre Spaltprodukte eine unterschiedliche Wanderung im Plattengel aufweisen. In den Linien 1, 2, 3, 4 und 6 sind die Spaltprodukte der Proteine, in der Linie 5 das 106 Nukleotid umfassende Produkt nach RNase P-Spaltung und in der Linie 7 das Substrat als Kontrolle zu sehen. Die Spaltprodukte in den Linien 1, 2, 3, 4 und 6 zeigen gegenüber dem in Linie 5 eine geringere Wanderung im Plattengel. Sie haben eine Länge von 108 Nukleotiden.

Weiterhin ist zu erkennen, daß die Proteine L18 (Linie 3) und L25 (Linie 6), verglichen mit den anderen aufgetragenen Proteinen, über eine größere RNase-Aktivität verfügen, da die Banden ihrer Spaltprodukte eine stärkere Färbung im Plattengel aufweisen.

Aus Abb. 22 ist ebenfalls zu ersehen, daß die stabilen 5S RNS und 4S RNS von den ribosomalen Proteinen nicht gespalten werden (Linien 8-11).

Es konnte nachgewiesen werden, daß sich die Ribonuklease-Aktivitäten der ribosomalen Proteine bzw. des 5S RNS-Protein-Komplexes dadurch auszeichnen, daß sie nur die "4,5S precursor RNS" hydrolysierten, während tRNS, 5S RNS, 16S RNS und 23S RNS nicht gespalten wurden. Weitere Vorversuche zeigten, daß multicistronische RNS (eine RNS, die aus mehreren tRNS-Vorstufen besteht) ebenfalls als Substrat erkannt wurde.

Es konnte weiterhin ausgeschlossen werden, daß die mit den ribosomalen Proteinen oder mit dem [5S]-Komplex gefundene RNase-Aktivität weder mit RNase P noch mit RNase P_2 (SCHEDL et al. 1974) identisch ist. Es sei noch bemerkt, daß nahezu alle ribosomale Proteine, in hoher Konzentration eingesetzt, mit der "4,5S precursor RNS" einen Komplex bildeten.

In der folgenden Aufstellung sind die untersuchten ribosomalen Proteine hinsichtlich ihrer RNase Aktivitäten in "aktiv", "schwach aktiv" und "nicht aktiv" unterteilt.

Tabelle IV: RNase-Aktivität verschiedener ribosomaler Proteine von E. coli

aktiv	L2, L5, L16, L18, L20, L22, L24, L25, L27, S20
schwach aktiv	L1
nicht aktiv	L6, L10, L7/12, L13 S1, S5, S9

Diese Befunde lassen vermuten, daß eine neue Ribonuklease entdeckt worden ist, die aber noch einer weiteren Charakterisierung bedarf. Darüber hinaus ist die Tatsache interessant, daß ribosomale Proteine enzymatische Aktivitäten besitzen, die anscheinend in keinem direkten Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese stehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die enzymatischen Aktivitäten des 5S RNS-Protein-Komplexes von E. coli-Ribosomen und des um die 23S RNS vergrößerten RNS-Protein-Komplexes untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, daß in Gegenwart des Elongationsfaktors EF-G die bereits früher beschriebene GTPase-Aktivität des [5S]-Komplexes erhöht wird, während die ATPase-Aktivität des gleichen Komplexes unbeeinflußt bleibt. Eine weitere Steigerung der GTPase-Aktivität wurde durch Zugabe von EF-G zum [23S+5S]-Komplex erreicht.

Bei der Untersuchung des 5S RNS-Protein-Komplexes wurde festgestellt, daß neben den drei spezifischen Bindungsproteinen L5, L18 und L25 in Spuren noch einige weitere Proteine vorhanden waren, unter anderem auch die Proteine L10 und L7/12. Das Vorkommen der zuletzt genannten Proteine unterstützt den Befund, daß der Elongationsfaktor EF-G mit dem 5S RNS-Protein-Komplex in Wechselwirkung tritt. Die enzymatischen Aktivitätsuntersuchungen an dem [5S]-Komplex und an dem [23S+5S]-Komplex führen zu dem Schluß, daß einigen Strukturelementen in diesen RNS-Protein-Komplexen eine entscheidende Bedeutung in der Wechselwirkung mit dem Elongationsfaktor EF-G zukommt.

Es konnte in Versuchen mit einer Reihe von Antibiotika gezeigt werden, daß Fusidinsäure einen Einfluß auf die ribosomale GTPase-Wirkung ausübt, während die übrigen Antibiotika in dieser Hinsicht nicht aktiv waren. Eine Wechselwirkung zwischen der ribosomalen GTPase und der EF-G abhängigen GTPase erscheint möglich: In Gegenwart von Fusidinsäure könnte durch Hemmung der EF-G abhängigen GTPase eine Stimulierung der ribosomalen GTPase erreicht werden.

Es wurde ferner gefunden, daß einige der isolierten ribosomalen Proteinen ATPase und GTPase-Aktivitäten

aufweisen. Diese Enzymaktivität war nicht nur bei den 5S RNS-Bindungsproteinen sondern auch bei anderen Proteinen der 50S Untereinheit nachzuweisen. Durch Bindung an die 5S RNS konnte bei den 5S RNS-Bindungsproteinen eine Steigerung der enzymatischen Aktivität nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß eine Reihe von ribosomalen Proteinen eine RNase-Aktivität besitzen, die eine spezifische Hydrolyse der 4,5S Vorstufen-RNS bewirkt. Dagegen bleiben 23S RNS, 16S RNS und tRNS von dieser RNase-Aktivität unbeeinflußt. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit zu weiteren Untersuchungen über die funktionelle Bedeutung dieser neu gefundenen ribosomenspezifischen RNase-Aktivität.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Acharya, A. S., Moore, P. B. and Richards, F. M.:
Cross-linking of elongation factor EF-G to the 50S ribosomal subunit of E. coli.
Biochemistry 12, 3108 (1971)

Altman, S. and Smith, J. D.:
Biosynthesis of transfer RNA in E. coli.
Cell., Vol. 4, 2129 (1975)

Altman, S. and Smith, J. D.:
Tyrosine tRNS precursor molecule polynucleotide sequence.
Nature New Biol., 233, 35-39 (1971)

Altman, S. and Robertson, H. D.:
RNA precursor molecules and ribonucleares in E. coli.
Mol. Cell. Biochem., Vol. 1, 1, 83-93 (1973)

Aubert, M., Scott, J. F., Reynier, M. and Monier, R.:
Rearrangement of the conformation of E. coli 5S RNA.
Proc. Nat. Acad. Sci., 61, 292 (1968)

Bernardi, A. and Leder, P.:
Protein Biosynthesis in E. coli, Purification and Characteristics of a Mutant G Factor.
J. Biol. Chem., 245, 4263-4268 (1970)

Bodley, J. W., Zieve, F., Lin, L. and Zieve, S. T.:
Formation of the ribosome-G-factor-GDP-complex in the presence of fusidic acid.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 437-443 (1969)

Bodley, J. W., Lin, L., Salas, M. L. and Tao, M.:
Studies on the translocation: Fusidic acid stabilization of an eucaryotic ribosome-translocation factor-GDP-complex.
FEBS Lett., 11, 153-156 (1970)

Brownlee, G. F., Sanger, F. and Barrell:
The sequence of 5S RNA.
J. Mol. Biol., 34, 379-412 (1968)

Burns, D. J. W. and Cundliffe, E.:
Bacterial Protein Synthesis: A novel system for studying Antibiotic in vivo.
Eur. J. Biochem., 37, 570-574 (1973)

Cabrer, B., Vazquez, D. and Modolell, J.:
Inhibition by EF-G of aminoacyl-tRNA binding to ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 733-736 (1972)

Cantor, C. R., Pellegrini, M. and Oen, H. (1974)
In Ribosomes, eds., Nomura, M., Tissières, A. and Lengyel,P. (Cold Spring Harbor Labaratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), pp. 573-585

Cashel, M. and Kalbacher, B.:
The control of RNA snythesis in E. coli.
J. Biol. Chem., 245, 2309-2318 (1970)

Cerná, G., Rydelik, I. and Lichtenthaler, F. W.:
The effect of aminoacyl-4-aminohexosyl-cytosine group of antibiotica on ribosomal peptidyl transferase.
FEBS Lett., 30, 147-150 (1973)

Cohlberg, G. A. and Nomura, M.:
Reconstitution of Bac. stearothermophilus 50S ribosomal subunit from purified molecular components.
J. Biol. Chem., 251, 209-221 (1976)

Cold Spring Harbor "Ribosomes", eds. Nomura, M., Tissières, A. and Lengyel, P., Cold Spring Harbor, N.Y.

Davies, J., Gilbert, W. and Gorini, L.:
Streptomycin, Suppression and the code.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 51, 883-889 (1964)

Dubnoff, G. S. and Maitra, K.:
Isolation and propertion of protein factors involved in polypeptide chain initiation in E. coli.
Meth. in Enzymol. 20, 248-361 (1971)

Ehresmann, G., Stiegler, P., Fellner, P., Ebel, G.-P.:
The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of E. coli. (II) Nucleotide sequences of products from partial enzymatic hydrolysis.
Biochim. 54, 901-967 (1972)

Eikenberry, E., Bickle, T., Traut, R. and Price, C.:
Separation of large quantities of ribosomal subunits by zonal ultrazentrifugation.
Eur. J. Biochem. 12, 113-116 (1970)

Erdmann, V. A., Fahnestock, S. and Nomura, M.:
Reconstitution of 50S ribosomes from 23S and 5S RNA and protein components.
Fed. Proc. 30, 1203 (1971)

Erdmann, V. A.:
Structure and function of the 5S RNA and 5,8S RNA.
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. (ed. W. E. Cohn)
18, 45-90 (1976)

Erdmann, V. A., Fahnestock, S., Higo, K. and Nomura, M.:
Role of 5S RNA in the function of 50S ribosomal subunits.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2932-2936 (1971)

Erdmann, V. A., Doberer, H. G. and Sprinzl, M.:
Structure and function of 5S RNA: The role of the 3'terminus in 5S RNA function.
Mol. Gen. Genet. 114, 89-94 (1971)

Erdmann, V. A., Sprinzl, M. and Pongs, O.:
Involvement of 5S RNA in the binding of tRNA.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 942-948 (1973)

Expert-Besançon, A., Guérin, M.-F., Hayes, D. H., Legault, L. and Thibault, J.:
Preparation of E. coli ribosomal subunits without loss biological activity.
Biochem. 56, 77-89 (1974)

Fahnestock, S. R. and Nomura, M.:
Activity of ribosomes containing 5S RNA with chemically modified 3'terminus.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 363-366 (1972)

Fernandez-Munoz, R. and Vazquez, D.:
Antibiotics 26, 107-108 (1973)

Feinstein, G., Monier, R., Garrett, R. A., Legret, M. and Lepecq, J. B.:
Effect of 50S subunit proteins L5, L18 and L25 on the fluorescence of 5S RNA bound Ethidium Bromid.
J. Mol. Biol. 93, 535 (1975)

Garrett, R. A., Müller, S., Spierer, P. and Zimmermann,R.A.:
Binding of 50S ribosomal subunit proteins to 23S RNA of E. coli.
J. Mol. Biol. 88, 553-557 (1974)

Garrett, R. A. and Wittmann, H. G.:
Struktur und Funktion des Ribosoms.
Endeavour 32, Nr. 115, 8-111 (1973)

Gaunt-Kloepfer, M. and Erdmann, V. A.:
ATPase and GTPase activities associated with 5S RNA - protein-complex of E. coli ribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 390, 226-230 (1975)

Gray, P., Bellemare, G., Monier, R., Garrett, R. and Stöffler, G.:
Identification of the nucleotide sequence involved in the interaction between E. coli 5S RNA and specific 50S subunit proteins.
J. Mol. Biol. 77, 133-152 (1973)

Gray, P. N., Garrett, R. A., Stöffler, G. and Monier, R.:
An attempt at the identification of the proteins involved in the incorporation of 5S RNA during 50S ribosomal subunit assembly.
Eur. J. Biochem. 28, 412 (197)

Grummt, F., Grummt, I. and Erdmann, V. A.:
ATPase and GTPase activities from rat liver ribosomes.
Eur. J. Biochem. 43, 343-348 (1974)

Hardy, S., Kurland, C. G., Voynow, P. and Mora, G.:
The ribosomal proteins of E. coli I. Purification of the 30S ribosomal proteins.
Biochem. 8, 2897-2905 (1969)

Hamel, E. and Nakamoto, T.:
Studies on the role of an E. coli 50S ribosomal component in polypeptide chain elongation.
J. Biol. Chem. 247, 6810 (1972)

Haselkorn, R. and Rothmann-Denes:
Protein Synthesis.
Ann. Rev. Biochem. 42, 397-438 (1973)

Haseltine, W., Block, R., Gilbert, W. and Weber, K.:
MS I and MS II made on the idling step of protein synth.
Nature 238, 381-384 (1972)

Haseltine, W. and Block, R.:
Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1564-1568 (1973)

Herr, W. and Noller, M. F.:
A fragment of 23S RNA containing a nucleotide sequence complementary to a region of 5S RNA.
FEBS Lett. 53, 248 (1975)

Highland, J., Bodley, J., Hasenbank, R. and Stöffler, G.:
Identity of the ribosomal proteins involved in the interactions with elongation factor G.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 142-150 (1973)

Homann, H. E. and Nierhaus, K. H.:
Ribosomal proteins, protein compositions of biosynthetic precursors and artifical subparticals from ribosomal subunits in E. coli K12.
Eur. J. Biochem. 20, 249-257 (1971)

Horne, J. R. and Erdmann, V. A.:
ATPase and GTPase activities associated with a specific 5S RNS-protein-complex.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2870-2873 (1973)

Horne, J. R. and Erdmann, V. A.:
Isolation and characterisation of 5S RNA-protein-complex

from Bac. stearothermophilus and E. coli ribosomes.
Mol. Gen. Genet. 119, 337-344 (1972)

Horne, J. R. and Erdmann, V. A.:
Effects of ethanol, methanol and different antibiotics on the ATPase and GTPase activities associates with Bac. stearothermophilus 5S RNa-protein-complex.
FEBS Lett. 42, 42 (1974)

Horne, J. R.:
Untersuchungen zur Struktur und Funktion von 5S RNS-Protein-Komplexen an Bac. stearothermophilus und E. coli.
Doktorarbeit, FU Berlin (1974)

Jordan, B. R.:
Studies on 5S rRNA conformation by partial ribonuclease hydrolysis.
J. Mol. Biol. 55, 423-439 (1971)

Kaltschmidt, E. and Wittmann, H. G.:
Two-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins.
Analyt. Biochem. 36, 401-412 (1970)

Kischna, K., Möller, W. and Stöffler, G.:
Reconstitution of a GTPase activity by a 50S ribosomal protein.
Nature New Biol. 233, 62-63 (1971)

Kurland, C. G.:
Characterisation of ribonucleic acid from E. coli ribosomes.
J. Mol. Biol. 2, 83-91 (1960)

Lai, C. J., Weisblum, B., Fahnestock, S. R. and Nomura,M.:
Alteration of 23S ribosomal RNA Erythromycin-induced resistance to Lincomycin and Spiramycin in Staphylococcus aureus.
J. Mol. Biol. 74, 67-72 (1973)

Lake, J. A., Sabatini, D. D. and Nonomura, Y. (1974) in Ribosomes, eds. Nomura, M., Tissières, A. and Lengyel, P. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), pp. 543-557

Lin, A., Collatz, E. and Wool, I. G.:
Micro scale two dimensional polyacrylamid gel electrophoresis of ribosomal proteins.
Mol. Gen. Genet. 144, 1-9 (1976)

Lucas-Lenard, J. and Lipman, F.:
Protein Biosynthesis.
Ann. Rev. Biochem. 40, 409-448 (1971)

Luzzatto, L., Apirion, D. and Schlessinger, D.:
Polyribosomes deplation and blockage of the ribosome cycle by Streptomycin in E. coli.
J. Mol. Biol. 42, 305-335 (1969)

Maassen, J. and Möller, W.:
Identification by photo-affinity labeling of the proteins in E. coli ribosomes involved in Elongation factor G dependent GDP-binding.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1277-1280 (1974)

Matthaei, H. and Nirenberg, M.:
The dependence of cell free protein synthesis in E. coli upon naturally occuring or synthetic polyribonucleotides.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 47, 1588 (1961)

Miller, D. L.:
Elongation Factors EF-Tu and EF-G interact at related sites on ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 752 (1972)

Modolell, G. and Vazquez, D.:
Inhibition by aminoacyltransfer ribonucleic acid of elongation factor G dependent binding of guanosine nucleotide to ribosmes.
J. Biol. Chem. 248, 488 (1973)

Monier, R. (1974) in Ribosomes, eds. Nomura, M., Tissières, A. and Lengyel, P. (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y.), pp. 141-168

Nierhaus, K. H. and Dohme, F.:
Total reconstitution of functionally activ 50S ribosomes subunits of E. coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4713-4717 (1974)

Nomura, M. and Erdmann, V. A.:
Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components.
Nature 228, 144-148 (1970)

Nierhaus, D. and Nierhaus, K. H.:
Identification of the chloramphenicol binding protein in E. coli ribosomes by partial reconstitution.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2224-2228 (1973)

Nierhaus, K. H. und Weber, J.:
Struktur und Funktion der Ribosomen.
Umschau 72, 346-352 (1972)

Ofengand, J. and Henes, G.:
The function of pseudouridylic acid in transfer ribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 244, 6241-6253 (1969)

Parmeggiani, A., Singer, C. and Gottschalk, E. M.:
in Methods of Enzymology, eds. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Academic Press, N.Y.) 20, 291-302 (1971)

Paecock, A. and Dingman, C.:
Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochem. 6, 1818-1827 (1967)

Pedersen, F. S., Lund, E. and Kjeldgaard, N. O.:
codon-specific, tRNA dependent in vitro synthesis of ppGpp and pppGpp.
Nature New Biol. 243, 13-15 (1973)

Pestka, S.:
Insights into protein biosynthesis and ribosome function through inhibitors.
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. (ed. W. E. Cohn)
17, 217-245 (1976)

Pestka, S.:
Peptidyl-puromycin synthesis on the polyribosomes from E. coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 624-628 (1972)

Pestka, S.:
Studies of the formation of transfer RNA-ribosome-complexes on the function of a soluble transfer factor in protein synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 61, 726-733 (1968)

Pongs, O., Bald, R. and Erdmann, V. A.:
Identification of chloramphenicol binding protein in E. coli by affinity labeling.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2229-2233 (1973)

Pongs, O., Nierhaus, K. H., Erdmann, V. A. and Wittmann, H. G.: Active sites in E. coli ribosomes.
FEBS Lett. 40, Supplement, 528-537 (1974)

Raacke, I. D.:
A model for protein synthesis involving the intermediate formation of peptidyl-5S RNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2357-2360 (1971)

Ravel, J. M. and Shorly, R. L.:
GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to E. coli ribosomes.
Meth. in Enzymol. 20, 306-316 (1971)

Rich, A. and RajBhandary, U. L.:
Transfer RNA moleculare structure, sequence and properties.
Ann. Rev. Biochem. 45, 805-860 (1976)

Richards, E. G., Lecanidou, R. and Gerods, M. E.:
The kinetics of renaturation of 5S RNS from E. coli in the presence of magnesium-ions.
Eur. J. Biochem. 34, 262 (1973)

Richman, N. and Bodley, J. W.:
Ribosomes cannot interact simutaneously with elongation factor EF-Tu and EF-G.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 686 (1972)

Richter, D., Erdmann, V. A. and Sprinzl, M.:
Spezific recognition of the GT C Loop (Loop IV) of tRNA by 50S ribosomal subunits from E. coli.
Nature New Biol. 246, 132-135 (1973)

Richter, D.:
Inability of E. coli ribosomes to interact simultaneously with the bacterial elongation factors EF-Tu and EF-G.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1850 (1972)

Richter, D., Erdmann, V. A. and Sprinzl, M.:
A new transfer RNA-fragment reaction: Tp pCpGp bound to a ribosome-messenger RNA complex induces the synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphates.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3226-3229 (1974)

Robertson, H. D., Altman, S. and Smith, J. D.:
Purification and properties of a specific E. coli ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor.
J. Biol. Chem. 247, 5243-5251 (1972)

Rosset, R. and Monier, R.:
A propos de la présence d'acide ribonucléique de faible poids moléculaire dans les ribosomes d' E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 68, 653-656 (1963)

Sander, G., Marsh, R. and Parmeggiani, A.:
Role of split proteins from 30S subunits in the ribosome-EF-T-GTPase reaction.
FEBS Lett. 33, 132-134 (1973)

Sander, G., Marsh, R. and Parmeggiani, A.:
Isolation and characterization of two acidic proteins from the 50S subunit required for GTPase activities of both EF-G and EF-Tu.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 866-873 (1972)

Sander, G. and Parmeggiani, A.:
Activity of 50S CsCl cores in ribosomal EF-G and EF-T GTPases in E. coli.

Ribosomes and RNA Metabolism 2 (J. Zelinka and J. Balan, eds.) pp. 291-300, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava (1976)

Schäfer, K. P. and Söll, D.:
New aspects in tRNA biosynthesis.
Biochim. 56, 795-804 (1974)

Schedl, P., Primakoff, P. and Roberts, J.:
Processing of E. coli tRNA precursors.
Brookhaven Symposia in Biology 26, 53-76 (1974)

Schrier, P., Maassen, J. and Möller, W.:
Involvement of 50S ribosomal proteins L6 and L10 in the ribosome dependent GTPase activity of elongation factor G.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 53, 90-98 (1973)

Schrier, P. and Möller, W.:
The involvement of 50S ribosomal protein L11 in the EF-G dependent GTP hydrolysis of E. coli ribosomes.
FEBS Lett. 54, 130-134 (1975)

Shimuzu, N., Hayashi, H. and Miura, K.:
Functional site of transfer RNA for binding to messenger RNA-ribosome complex.
J. Biochem. 67, 373-387 (1970)

Sopori, M. L. and Lengyel, P.:
Components of the 50S ribosomal subunit involved in GTP cleavage.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 238 (1972)

Spierer, P., Zimmermann, R. A. and Mackie, G. A.:
RNA-protein interaction in the ribosome. VII. Binding of 50S subunit proteins to 5'- and 3'-terminal fragments of 23S RNA.
Eur. J. Biochem. 52, 459-468 (1975)

Sprinzl, M., Wagner, T., Lorenz, S. and Erdmann, V. A.:
Regions of tRNA important for binding to the ribosomal A and P site.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 357, 304 (1976)

Stöffler, G., Daya, L., Rak, K. H. and Garrett, R. A.:
Ribosomal proteins XXX. Specific protein binding sites on 23S RNA of E. coli.
Mol. Gen. Genet. 114, 25 (1971)

Sy, J. and Lipmann, F.:
Identification of the synthesis of ppGpp as insertion of a pyrophosphate group into the 3' position in GDP 5'.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 306-309 (1973)

Tanaka, S., Otaka, T. and Kaji, A.:
Further studies of the mechanisme of Erythromycin action.
Biochim. Biophys. Acta 331, 128-140 (1973)

Traub, P. and Nomura, M.:
Structure and function of E. coli ribosomes, V.
Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 59, 777-784 (1968)

Traub, P., Mizushima, S., Lowry, C. V. and Nomura, M.:
Reconstitution of Ribosomes from subribosomal components.
Meth. in Enzymol. 20, 391-407 (1971)

Traut, R. R., Heimark, R. L., Sun, T.-T., Hershey, J. W. B. and Bollen, A.: (1974) in Ribosomes, eds. Nomura, M., Tissières, A. and Lengyel, P. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) pp. 271-308

Tischendorf, G. W., Zeichardt, H. and Stöffler, G.:
The architecture of the E. coli ribosome as determinant by Immune-Electrone Microscopy.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 48.20-4824 (1975)

Vazquez, D.:
Inhibitors of protein synthesis.
FEBS Lett. 40, 63-84 (1974)

Vazquez, D.:
Binding of Chloramphenicol to ribosomes, the effects of a number of Antibiotics.
Biochim. Biophys. Acta 114, 277-288 (1966)

Weber, K. and Osborne, M.:
The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

Weissbach, H., Redfield, B., Yamashi, E., Davis jr., R.C., Pestka, S. and Brot, N.:
Studies on the ribosomal sites involved in factors Tu-and G-dependent reactions.
Arch. Biochem. Biophys. 149, 110 (1972)

Wittmann, H. G.:
Structure, function and evolution of ribosomes.
Eur. J. Biochem. 61, 1-13 (1976)

Wolf, H. J., Chinali, G. and Parmeggiani, A.:
Kirromycin, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4910 (1974)

Wrede, P. and Erdmann, V. A.:
Activities of Bac. stearothermophilus 50S ribosomes reconstituted with prokaryotic and eukaryotic 5S RNA.
FEBS Lett. 33, 315-319 (1973)

Yu, R.S.T. and Wittmann, H. G.:
The sequence of steps in the attachement of 5S RNA to cores of E. coli ribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 324, 375 (1973)

Zimmermann, J. and Erdmann, V. A.:
Localisation of the binding sites of E. coli and Bac. stearothermophilus 50S subunit proteins in E. coli 5S RNA.
Mol. Gen. Genet., in Vorbereitung (1976)

Zimmermann, J.:
5S RNS-Protein-Komplex aus Bac. stearothermophilus und E. coli: Vergleich der Basensequenzen in den proteinbindenden Regionen.
Doktorarbeit, FU Berlin (1975)

7. ANHANG

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	= Abbildung
Bac. stearothermorphilus	= Bacillus stearothermophilus
E. coli	= Escherichia coli
rRNS	= ribosomale Ribonukleinsäure
tRNS	= transfer Ribonukleinsäure
mRNS	= messenger Ribonukleinsäure
A	= Adenin
G	= Guanin
T	= Thymidin
C	= Cytosin
	= Pseudouridin
EF-G	= Elongationsfaktor EF-G
EF-Tu	= Elongationsfaktor EF-Tu
cpm	= Impulse pro Minute (counts per minute)
U.p.M.	= Umdrehungen pro Minute
pMol	= Pikomole (10^{-12} Mole)
M	= molar
mM	= millimolar
ug	= Mikrogramm
ATPase	= ATP-Phosphohydrolase
GTPase	= GTP-Phosphohydrolase
DNase	= Desoxyribonuklease
RNase	= Ribonuklease
EDTA	= Äthylendiamin-tetra-acetat
DMSO	= Dimethylsulfoxyd
P_i	= anorganisches Phosphat
ATP	= Adenosintriphosphat
GTP	= Guanosintriphosphat
Tris	= Tris-hydroxymethyl-aminomethan (2-Amino-2-hydroxymethylpropan 1,3-diol)
fMet	= Formylmethionin

$tRNS^{Phe}$	= Phenylalanin-spezifische tRNS
MS	= Magic Spot
ppGpp	= Guanosintetraphosphat
pppGpp	= Guanosinpentaphosphat
Ä.E.	= Äquivalente Einheiten (1 Ä.E. = die Menge Protein, die aus 1 A_{260} Einheit Ribosom erhalten wurde)
A_x	= Absorption bei Wellenlänge x
NDS	= Natriumdodecylsulfat
Poly (U)	= Polyuridilsäure
5S	= 5S RNS-Protein-Komplex, der aus 5S RNS und Proteinen von E. coli besteht
23S+5S	= 23S RNS-und 5S RNS-Protein-Komplex, der aus 23S RNS, 5S RNS und Proteinen von E. coli besteht

7.2. Danksagung

Die Arbeit wurde durchgeführt am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin in der Abteilung von Herrn Professor H. G. Wittmann.

Herrn Professor H. G. Wittmann danke ich für die großzügige Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. V. A. Erdmann. Seine stete Diskussionsbereitschaft und fördernde Kritik trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Neben allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe gilt insbesondere mein Dank Frau H. Ungewickell für ihre kollegiale Hilfe.

Weiterhin danken möchte ich der EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANISATION, insbesondere ihrem Sekretär Dr. J. Tooze für die Gewährung eines "short term fellowship". Diese Unterstützung ermöglichte mir einen dreimonatigen Studienaufenthalt in den U.S.A.

Ferner gilt man Dank Herrn Professor S. Altman und seinen Mitarbeitern von dem Biology Department der Yale Universität in New Haven. Die Zusammenarbeit mit ihnen wirkte sich fruchtbar für die Weiterführung dieses Projektes aus.

7.3. Lebenslauf

2. Mai 1945	geboren in Braunschweig, Niedersachsen
1951 - 1965	Besuch der Volksschule, der Realschule und des Gymnasiums in Gifhorn, Niedersachsen
1965	Zeugnis der Hochschulreife
1965 - 1967	Studium an der Universität Göttingen in den Fächern Biologie, Geographie und Sport
1967 - 1969	Pharmazeutisches Praktikum in einer Apotheke in Gifhorn, Niedersachsen
1969	Pharmazeutisches Vorexamen in Lüneburg
1969 - 1970	Beschäftigung als Apotheker-Kandidat in einer Apotheke in Berlin-Spandau
1970 - 1973	Studium der Pharmazie an der Technischen und Freien Universität in Berlin
1973	Staatsexamen in Pharmazie an der Freien Universität in Berlin
1973	Beginn der Doktorarbeit unter Leitung von Herrn Professor H. G. Wittmann und Herrn Dr. V. A. Erdmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin
1975	Studienaufenthalt an der Yale-University, New Haven, U.S.A.

Dissertationsdruck Monath, Bln. 46, Tel. 775 47 77